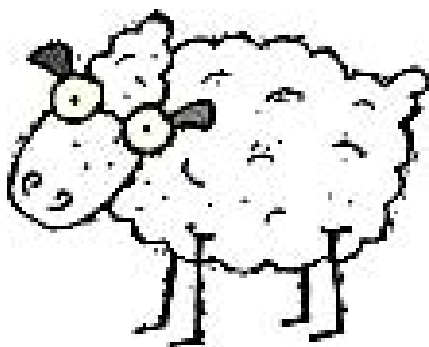




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Έλεγχος ύπαρξης πολυμορφισμών στα γονίδια
TLR9 και MyD88 στο είδος *Ovis aries***



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΚΑΛΟΖΟΥΜΗ ΓΕΩΡΓΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2010

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας, του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλλαν με το δικό τους τρόπο στην εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ζήση Μαμούρη για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου αναθέτοντάς μου ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον ερευνητικό έργο. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο Διδάκτορα Κώστα Σταμάτη για την καθοδήγηση, το ενδιαφέρον του και τις πολύτιμες συμβουλές κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων όπως επίσης και κατά τη συγγραφή της διατριβής. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας και ιδιαίτερα τη Λέκτορα μοριακής γενετικής ζωικών οργανισμών, Θεολογία Σαραφίδου, και τους υποψήφιους Διδάκτορες, Θεμιστοκλή Γιαννούλη και Ευαγγελία Κουτσογιαννούλη, για την πολύτιμη βοήθεια τους και το φιλικό κλίμα συνεργασίας.

Τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής είναι:

- **Μαμούρης Ζήσης**, Καθηγητής του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- **Μούτου Κατερίνα**, Επίκουρος Καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- **Σαραφίδου Θεολογία**, Λέκτορας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
Άμυνα του οργανισμού - μηχανισμοί ανοσίας.....	6
<i>Brucella</i> : το αίτιο της βρουκέλλωσης.....	7
Άμυνα κατά της <i>Brucella abortus</i>	9
Υποδοχείς TLR.....	11
TLR9, MyD88 και <i>Brucella</i>	14
Δομή και λειτουργικές περιοχές του TLR9.....	16
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	19
Ανάλυση SSCP.....	19
ΣΚΟΠΟΣ.....	21
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	22
1. Δείγματα.....	23
2. Απομόνωση του DNA.....	23
3. Ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος DNA.....	25
4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	25
5. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	27
6. Ανάλυση SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)	
Α. Αποδιάταξη προϊόντων PCR.....	28
Β. Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης.....	28
Γ. Χρώση των πηκτωμάτων πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο (Silver Staining).....	29
7. Αλληλούχηση DNA.....	30
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	31
1. Ενίσχυση τμημάτων των γονιδίων <i>TLR9</i> και <i>MyD88</i> σε άτομα <i>Ovis aries</i> με PCR.....	32
2. Ανάλυση SSCP.....	37
3. Αλληλούχηση.....	41
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	52

Έλεγχος ύπαρξης πολυμορφισμών στα γονίδια *TLR9* και *MyD88* στο είδος *Ovis aries*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα προϊόντα των γονιδίων *TLR9* και *MyD88* διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην ανοσοαπόκριση που επάγεται από το βακτήριο *Brucella abortus* στα θηλαστικά. Η *Brucella abortus* είναι το παθογόνο που προκαλεί την βρουκέλλωση, μια ζωοανθρωπονόσο που έχει ως κύρια ζημιογόνο συνέπεια την αποβολή στα πρόβατα (*Ovis aries*). Σκοπός της εργασίας ήταν η διερεύνηση της ύπαρξης πολυμορφισμών στα παραπάνω γονίδια που θα μπορούσαν να επηρεάζουν τη δομή και την λειτουργία των αντίστοιχων πρωτεϊνών και, κατ' επέκταση, το μηχανισμό της ανοσοαπόκρισης συνολικά. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή της μεθόδου PCR-SSCP και ακόλουθη αλληλούχηση των αντιπροσωπευτικών προτύπων. Το αποτέλεσμα ήταν η ταυτοποίηση επτά διαφορετικών αλληλομόρφων για το *TLR9* και δύο για το *MyD88*, σε εκατό περίπου άτομα που εξετάστηκαν από τέσσερις πληθυσμούς. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την προκαταρκτική αυτή μελέτη μπορούν να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω μελέτες που αφορούν στον έλεγχο της πιθανής συσχέτισης των πολυμορφισμών με την ευπάθεια των ατόμων του κάθε πληθυσμού στην λοίμωξη από *Brucella abortus*.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Άμυνα του οργανισμού - μηχανισμοί ανοσίας

Η αντίσταση του οργανισμού σε μία νόσο και ειδικότερα σε ένα λοιμώδες νόσημα ονομάζεται ανοσία. Το άθροισμα των κυττάρων, ιστών και μορίων που μεσολαβούν στην αντίσταση σε λοιμώξεις ονομάζεται ανοσοποιητικό σύστημα. Η συντονισμένη αντίδραση των συστατικών του ανοσοποιητικού συστήματος, για την αντιμετώπιση των παθογόνων μικροοργανισμών που εισβάλλουν στον οργανισμό, ονομάζεται ανοσοαπόκριση. Οι μηχανισμοί άμυνας του οργανισμού περιλαμβάνουν την φυσική ανοσία και την επίκτητη ανοσία.

Η φυσική ανοσία αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού κατά των παθογόνων και βασίζεται σε αναγνώριση δομών κοινών σε διάφορα είδη μικροοργανισμών. Αυτός ο τύπος ανοσίας παρέχεται από τους επιθηλιακούς φραγμούς και από εξειδικευμένα κύτταρα και αντιβιοτικά των επιθηλίων, τα οποία έχουν ως σκοπό την παρεμπόδιση της εισόδου των μικροοργανισμών. Εάν τελικά καταφέρουν να εισέλθουν διαπερνώντας τα επιθήλια, οι μικροοργανισμοί δέχονται επίθεση από τα φαγοκύτταρα, τα φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα (NK) και από διάφορες πρωτεΐνες του πλάσματος, που αποτελούν επίσης συστατικά της φυσικής ανοσίας.

Η επίκτητη ανοσία αποτελείται από τα λεμφοκύτταρα και τα προϊόντα τους (π. χ. αντισώματα) και ενεργοποιείται μόνο μετά την είσοδο των μικροοργανισμών ή των αντιγόνων τους, ενώ χαρακτηρίζεται από την δημιουργία εξειδικευμένων μηχανισμών για την αντιμετώπιση διάφορων τύπων λοιμώξεων ανάλογα με το αίτιό τους. Πιο συγκεκριμένα, μετά την είσοδο του παθογόνου μικροοργανισμού π.χ. ενός βακτηρίου, τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs), δηλαδή τα δενδριτικά και τα μακροφάγα, φαγοκυτταρώνουν το παθογόνο, και παρουσιάζουν το ίδιο ή τμήματά του στα T και στα B λεμφοκύτταρα μέσω των μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC), μόρια απαραίτητα για την αναγνώριση των πεπτιδικών αντιγόνων από τα λεμφοκύτταρα.

Μέσα στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs), ειδικές δομές του παθογόνου (PAMPs) που αναγνωρίζονται από αντίστοιχους υποδοχείς του κυττάρου (PRRs), ενεργοποιούν μονοπάτια που οδηγούν στην έκφραση

των απαραίτητων κυτοκινών (π.χ.IL-2) και συνδιεγερτικών μορίων για να ενεργοποιηθούν τα T λεμφοκύτταρα. Τα T λεμφοκύτταρα, στη συνέχεια, πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται προς CD4+ T λεμφοκύτταρα, τα οποία ονομάζονται και T βοηθητικά.

Τα T βοηθητικά λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται σε T βοηθητικά τύπου 1 ή 2 (T_{H1} ή T_{H2}), διενεργώντας κατάλληλα για την καταπολέμηση της λοίμωξης ανάλογα με το αίτιό της. Τα T_{H1} παράγουν ιντερφερόνη γ (IFN-γ), η οποία έχει μικροβιοκτόνο δράση, αφού ενεργοποιεί τα μακροφάγα. Επίσης παράγουν τις κυτοκίνες IL-2, IL-12, TNF-β που αποτελούν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, προάγουν δηλαδή την δημιουργία φλεγμονής για την καταπολέμηση της λοίμωξης. Τα T_{H2} παράγουν τις αντιφλεγμονώδεις IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, που οδηγούν σε έκκριση αντισωμάτων από τα B κύτταρα και αποκοκκίωση των σιτευτικών κυττάρων (IL-4), ενεργοποιούν τα ηωσινόφιλα (IL-5) κ.α. για την καταστροφή των παθογόνων. Γενικά δρουν ανταγωνιστικά προς τα T_{H1}, αφού καταστέλλουν τη φλεγμονή.

Η μοίρα του αδιαφοροποίητου T κυττάρου εξαρτάται από τα ερεθίσματα που δέχεται, ανάλογα με τη φύση του παθογόνου. Τα δενδριτικά και τα μακροφάγα ανταποκρίνονται σε ιούς και βακτήρια παράγοντας IL-12 και προωθούν τη διαφοροποίηση των T κυττάρων προς T_{H1}, αφού αυτή η πορεία είναι αποτελεσματική για την εξάλειψη των συγκεκριμένων παθογόνων.

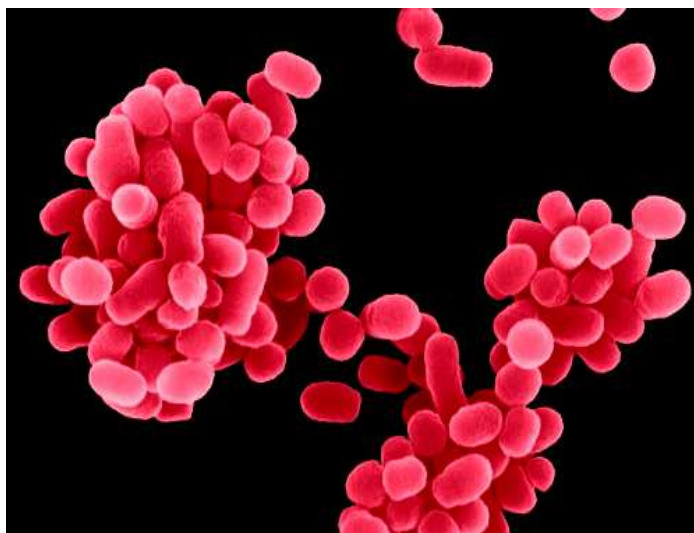
***Brucella*: το αίτιο της βρουκέλλωσης**

Το έναυσμα για την μελέτη της ***Brucella*** ήταν η πρώτη απομόνωση της *B. melitensis* από τον **Bruce** το **1887**, από σπλήνες στρατιωτών που πέθαιναν από **Μεσογειακό πυρετό** στη **Μάλτα**. Τελικά, όπως ανακαλύφθηκε 20 χρόνια αργότερα, η πηγή της μόλυνσης για τους ανθρώπους βρισκόταν στις αίγες. Είναι πλέον γνωστό ότι η *Brucella* αποτελεί το αίτιο της βρουκέλλωσης, μια σοβαρή ζωοανθρωπονόσο που είναι αρκετά διαδεδομένη παγκοσμίως και παρουσιάζει ενδημικό χαρακτήρα σε περιοχές όπως η Μεσόγειος, Μέση Ανατολή, Λατινική

Αμερική (Corbel 1997, Lopez-Merino 1989). Όλα τα είδη του γένους εκτός της *B. ovis* είναι παθογόνα για τον άνθρωπο.

Τα βακτήρια του γένους *Brucella* είναι αερόβια, έχουν τη μορφή κοκκοβάκιλλων ή κοντών ραβδίων μήκους 0.6 έως 1.5 μm και πλάτους 0.5 έως 0.7 μm, και παρατηρούνται κυρίως ως μονάδες ενώ λιγότερο συχνά σχηματίζουν ζεύγη ή μικρές ομάδες.

Παρόλο που μεταξύ των ειδών της *Brucella* υπάρχει μεγάλη ομολογία στο επίπεδο του DNA (>90% σε όλα τα είδη), γίνεται διαχωρισμός του γένους σε 6 είδη: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* και *B. canis* (Corbel and Brinley Morgan, 1984). Τα τέσσερα πρώτα είδη παρατηρούνται συνήθως στην λεία μορφή (S, smooth) ενώ οι *B. ovis* και *B. canis* έχουν απομονωθεί μόνο στην R (rough) μορφή.



Εικ 1. Το βακτήριο *Brucella abortus*

Η *Brucella abortus* είναι ένα αρνητικό κατά Gram, παθογόνο βακτήριο που αναπτύσσεται ενδοκυττάρια, και στο οποίο οφείλεται η **βρουκέλλωση** των βοοειδών. Στα πρόβατα και τις αίγες η ίδια ασθένεια προκαλείται κυρίως από την *B. melitensis* και σπανιότερα από την *B. abortus* (Luchsinger and Anderson, 1979, Garin-Bastuji *et al*, 1994) ή την *B. suis* (Paolicchi *et al*, 1993).

Πρόκειται για μια **μεταδοτική νόσο**, που προσβάλλει κυρίως το γεννητικό σύστημα των ζώων, με αποτέλεσμα την πρόκληση αποβολής (συνήθως σε μαιμόνο εγκυμοσύνη) και παροδική στειρότητα, γεγονότα που

οδηγούν σε οικονομική ζημία. Το μικρόβιο μπορεί να προσβάλλει και άλλα όργανα (μαστούς, αρθρώσεις) όπου είναι δυνατό να προκαλέσει σοβαρές βλάβες. Η *B.abortus* αποτελεί παθογόνο και για τον άνθρωπο, προκαλώντας πυρετό, αδυναμία, ενδοκαρδίτιδα, αρθρίτιδα, οστεομυελίτιδα και μηνιγγίτιδα.

Η βρουκέλλωση των βοοειδών είναι ζήτημα μείζονος σημασίας, ιδίως για τους ανθρώπους που ασχολούνται με τα βοοειδή (**επαγγελματική ζωοανθρωπονόσος**). Ο κύριος τρόπος μετάδοσης της νόσου είναι μέσω επαφής με τα μολυσμένα ζώα κατά το άρμεγμα, τον τοκετό, τη σφαγή και την επεξεργασία και κατανάλωση των προϊόντων τους.

Άμυνα κατά της *Brucella abortus*

Κατά τα αρχικά στάδια της λοίμωξης, το βακτήριο *B. abortus* εντοπίζεται κυρίως στους λεμφαδένες. Η λοίμωξη μπορεί να εξελιχθεί σε βακτηραιμία και αποικισμό της μήτρας, όπου ο μικροοργανισμός αναπαράγεται κατά προτίμηση εντός των τροφοβλαστών και τελικά προσβάλλεται ο πλακούντας με συνέπεια τον θάνατο του εμβρύου (αποβολή) κατά το τελευταίο τρίτο της κύησης.

Σε επίπεδο κυττάρου, η *Brucella* εισέρχεται στο κύτταρο του ξενιστή μέσω κυστιδίων που περιβάλλονται από λιπίδια, και αφού ενδοκυτταρωθούν, τα βακτήρια εντοπίζονται σε ένα διαμέρισμα που ονομάζεται BCV (*Brucella* containing vacuole). Πρόκειται για ένα κενोटόπιο, το οποίο όμως δεν συντήκεται με τα λυσοσώματα, αλλά αντ' αυτού συντήκεται με την μεμβράνη του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου (ΑΕΔ), όπου τελικά αναπαράγεται το βακτήριο.

Η απόκριση του οργανισμού κατά την λοίμωξη από *B. abortus* απαιτεί τη στρατολόγηση T λεμφοκυττάρων CD4+ και CD8+, κυτοκίνες τύπου T_{H1} όπως η ιντερφερόνη γ (IFN-γ) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων α (TNF-α), καθώς και ενεργοποιημένα μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα. Η πρώτη γραμμή των αμυντικών μηχανισμών ξεκινά με την αναγνώριση των PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) της *Brucella* από τους υποδοχείς PRRs (pattern recognition receptors) του μακροφάγου ή

δενδριτικού κυττάρου του ξενιστή. Τα **PAMPs** είναι ειδικά μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με την παθογένεια του βακτηρίου, τα οποία αναγνωρίζονται από ειδικούς υποδοχείς του ξενιστή, όπως οι **PRRs**. Αυτή η αναγνώριση ενεργοποιεί ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια που καταλήγουν σε επαγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών, χημειοκινών, ιντερφερονών και σε αύξηση των μορίων συνενεργοποιητών.

Υπάρχουν αρκετές λειτουργικά διακριτές τάξεις PRRs, εκ των οποίων οι καλύτερα χαρακτηρισμένοι είναι οι υποδοχείς **TLRs (Toll-like receptors)**. Οι TLRs είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς που ανιχνεύουν λιπίδια, λιποπρωτεΐνες, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα. Η αναγνώριση των PAMPs του βακτηρίου από τους TLRs οδηγεί σε στρατολόγηση μιας ομάδας ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών-προσαρμογών που περιέχουν περιοχή TIR, συμπεριλαμβανομένων των **MyD88**, TIRAP, TRIF, TRAM. Η **περιοχή TIR (Toll/IL-1R)** είναι ένα διαμεμβρανικό πρωτεϊνικό ομόλογο του υποδοχέα της IL-1, που κωδικοποιείται από το γονίδιο της πρωτεΐνης *Toll* της *Drosophila* (Gay, 1991). Κάθε πρωτεΐνη-προσαρμογέας που περιέχει την πρωτεϊνική περιοχή TIR αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες που διαθέτουν επίσης TIR, χρησιμοποιώντας τις αλληλεπιδράσεις (TIR-TIR) μεταξύ των ομόλογων αυτών περιοχών.

Όλοι σχεδόν οι TLRs έχουν κοινό σηματοδοτικό μονοπάτι, στο οποίο μόλις τα μόρια-προσαρμογείς σχηματίσουν ένα μοριακό σύμπλοκο μέσω TIR -TIR αλληλεπιδράσεων, ξεκινούν οι διαδικασίες μεταγωγής σήματος. Η ενεργοποίηση των TLRs ακολουθείται πρωτίστως από στρατολόγηση της πρωτεΐνης MyD88, μια αρκετά συνηθισμένη πρωτεΐνη-προσαρμογέας. Η πρωτεΐνη MyD88 διαθέτει μια TIR περιοχή στον C-τελικό άκρο, που συνδέεται με την TIR περιοχή του TLR (Hultmark, 1994), ενώ στο N-τελικό άκρο περιέχεται μια περιοχή DD (death domain) η οποία επιτρέπει αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες που διαθέτουν περιοχή DD (Boldin et al, 1995). Επιπροσθέτως, η MyD88 διαθέτει μια ενδιάμεση περιοχή ID (intermediate domain) η οποία είναι απαραίτητη για την TLR σηματοδότηση, καθώς αλληλεπιδρά με την κινάση (IRAK) που συνδέεται με τον υποδοχέα της ιντερλευκίνης 1 (IL-1R).

Αφού λοιπόν στρατολογηθεί η MyD88 από τον TLR, οι IRAK πρωτεΐνες προάγουν τη μεταγωγή του σήματος, αλληλεπιδρώντας με τον

παράγοντα TRAF6 (TNF receptor associated factor 6) (S.Li *et al*, 2002). Ο TRAF6 ρυθμίζει συγκεκριμένες διαδικασίες της φυσικής και της επίκτητης ανοσίας, που απαιτούν τη μεσολάβηση των κινασών IKK και MAP (όπως οι ERK, JNK και p38) οι οποίες ρυθμίζουν τους μεταγραφικούς παράγοντες Nf-κB και AP-1 που είναι υπεύθυνοι για την έκφραση κυτοκινών (όπως η IL-12).

Ένα διαφορετικό μονοπάτι που ενεργοποιείται από την MyD88 και τον TRAF6, όταν προσδένεται στον TLR7 ή στον TLR9 μονόκλωνο DNA (ssDNA) ή CpG-DNA από βακτήρια, είναι αυτό που περιλαμβάνει τον σχηματισμό του συμπλόκου του παράγοντα IRF7 (interferon regulatory factor 7). Το μονοπάτι αυτό καταλήγει στην ενεργοποίηση της μεταγραφής των ιντερφερονών (IFN) τύπου I (Kawai *et al*, 2004).

Υποδοχείς TLR

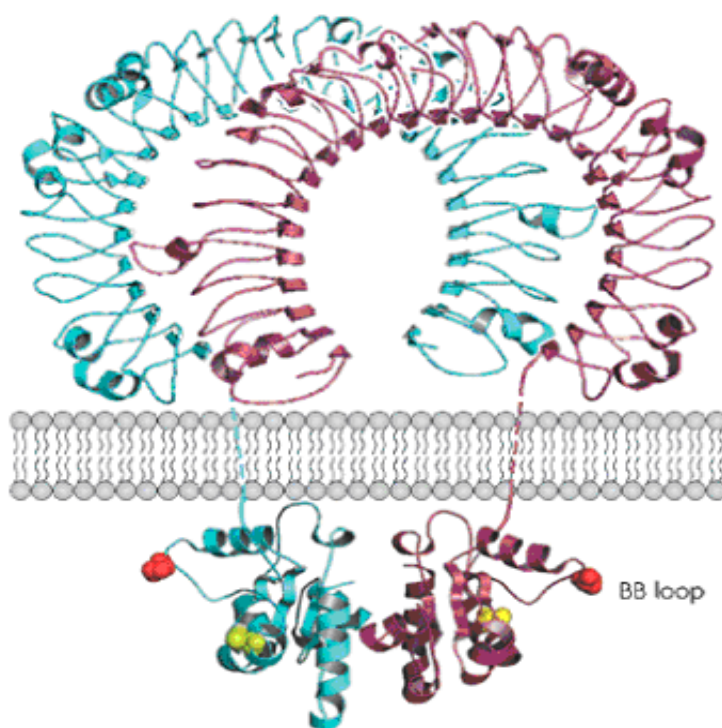
Έχουν ταυτοποιηθεί **11 TLR s** στα θηλαστικά έως σήμερα (Zhang *et al*, 2004). Πρόκειται για ενσωματωμένες στη μεμβράνη γλυκοπρωτεΐνες, τύπου I, με μοριακό βάρος 90-115 kD. Κάποιοι από αυτούς τους υποδοχείς βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων (π. χ. TLR1, TLR2, TLR4) ενώ κάποιοι άλλοι όπως π.χ. ο TLR9 παραμένουν σε ενδοκυτταρικά διαμερίσματα (Εικόνα 3). Ως αποτέλεσμα, η εξωμεμβρανική τους περιοχή (**ectodomain, ECD**) που αναγνωρίζει τα παθογόνα βρίσκεται είτε προς το εξωτερικό του κυττάρου, είτε προς το εσωτερικό του ενδοκυτταρικού διαμερίσματος στο οποίο εντοπίζονται.

Οι υποδοχείς TLR είναι πρωτεΐνες συντηρημένες εξελικτικά και διαθέτουν μια επίσης συντηρημένη, ενδοκυτταρική περιοχή TIR η οποία εμπλέκεται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και στην ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως αναλύθηκε παραπάνω. Η εξωμεμβρανική τους περιοχή (ECD) περιέχει επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη (**Leucine-rich repeats, LRRs**) που σχετίζονται με την αναγνώριση του προσδέτη και παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις μεταξύ των TLRs. Οι διαφοροποιήσεις αυτές αποτελούν τη βάση της ικανότητας τους να

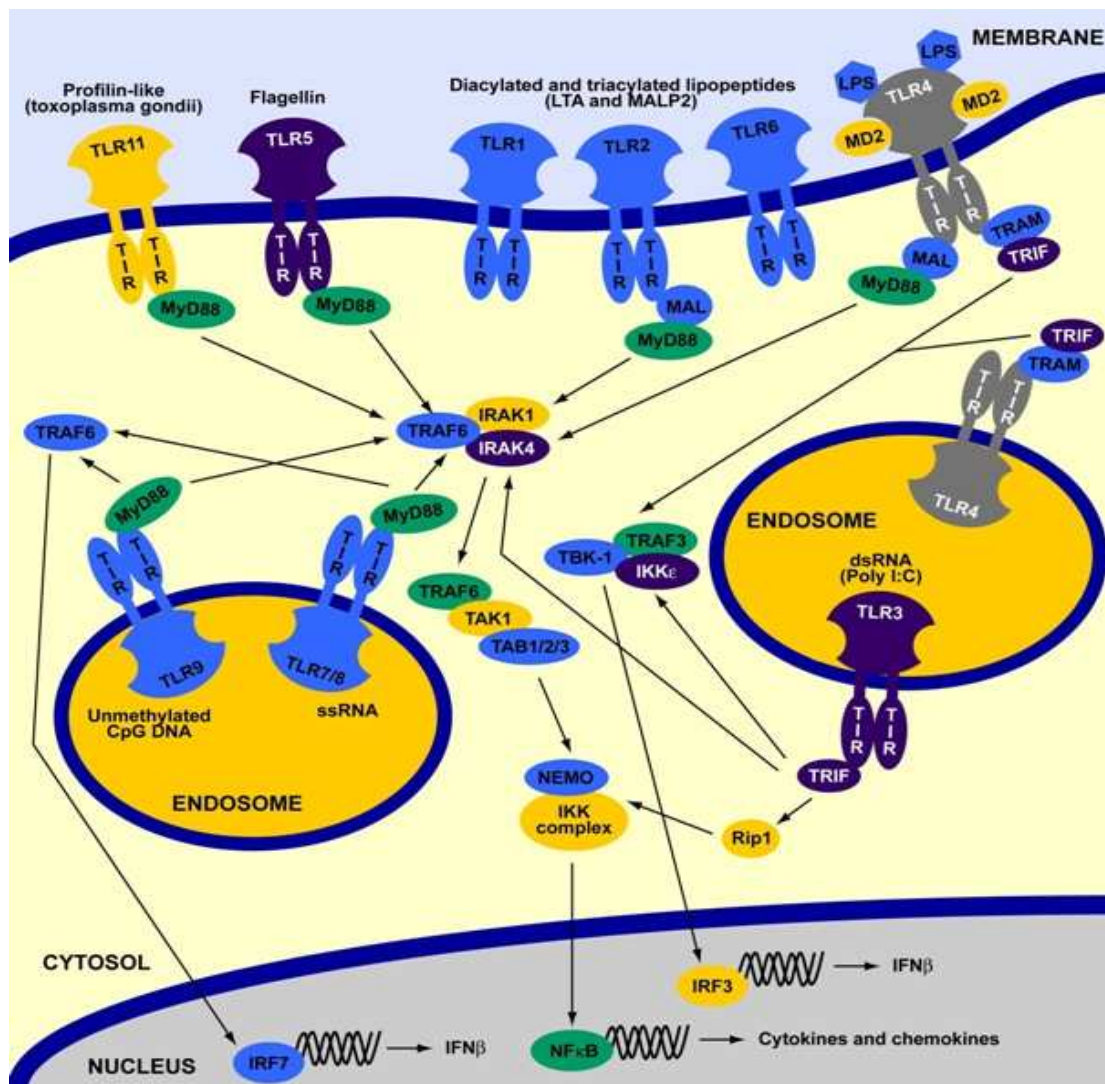
αναγνωρίζουν και να προσδένουν μια ευρεία ποικιλία παθογόνων ουσιών μέσω των διάφορων PAMPs που αυτές διαθέτουν.

Το σημαντικότερο γνωστό χαρακτηριστικό των περιοχών ECD των TLRs είναι ότι περιέχουν 19-25 συνεχόμενα αντίγραφα ενός μοτίβου LRR. Έχει προταθεί ότι το βασικό πλαίσιο των ECD των TLRs αποτελείται από μια σωληνοειδή δομή σε σχήμα πέταλου (Εικόνα 2), που περιέχει ένα εκτεταμένο β-πτυχωτό φύλλο στην κοίλη επιφάνειά του και αρκετές παρεμβαλλόμενες στις LRRs αλληλουχίες, που αποτελούν θέσεις πρόσδεσης PAMPs.(Bell *et al*, 2003).

Οι αλληλουχίες αυτές μαζί με το β-πτυχωτό φύλλο παρέχουν μια ευρεία επιφάνεια πρόσδεσης, που είναι 10 φορές μεγαλύτερη σε μέγεθος από αυτή των αντισωμάτων. Οι παρεμβαλλόμενες αυτές αλληλουχίες που διακόπτουν τα συνεχή αντίγραφα των LRRs διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην αναγνώριση των PAMPs.



Εικ.2: Η γενική δομή του TLR.

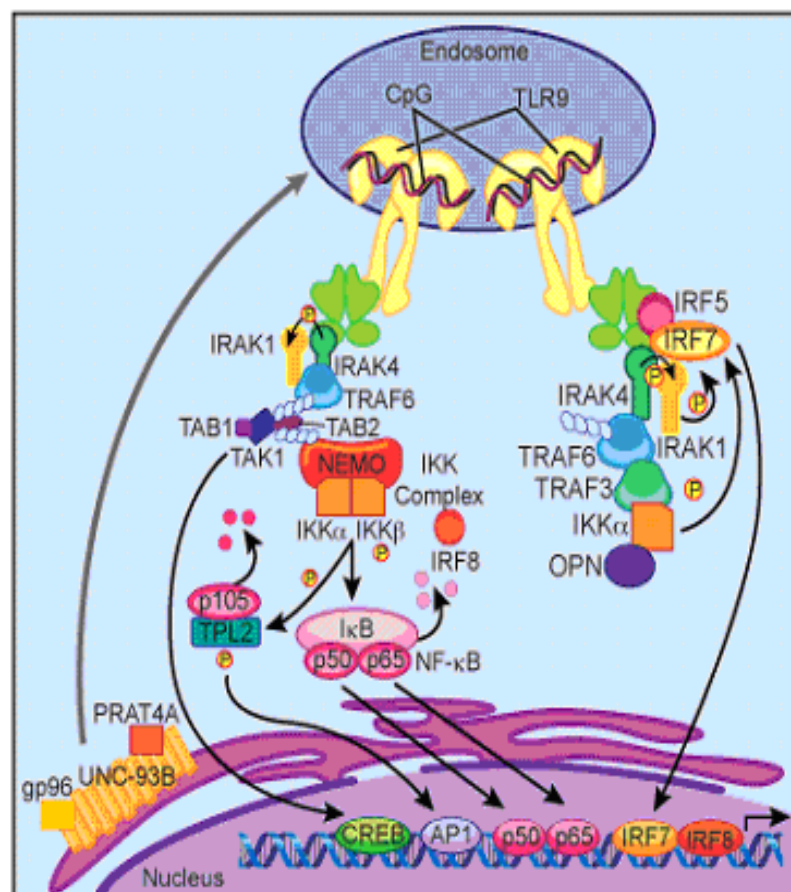


Εικ. 3: Υποκυτταρικός εντοπισμός των υποδοχέων TLR και σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν. Διακρίνονται μεταξύ άλλων: πρωτεΐνες-προσαρμογείς όπως η MyD88, κινάσες IRAK, και οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κB και IRF7 οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών και το ιντερφερόνης γ, αντίστοιχα.

TLR9, MyD88 και *Brucella*

Σχετικά με τους TLRs και την *Brucella* :

- Ο **TLR2** αναγνωρίζει τις λιποπρωτεΐνες L-Omp16 και L-Omp19 της *Brucella*, εκτός του κυττάρου, και μέσω MyD88 οδηγεί σε έκκριση TNF-α, IL-6, IL-10, και IL-12 από τα μακροφάγα.
- Ο **TLR4** αναγνωρίζει ως προσδέτη το μη συμβατικό LPS (λιποπολυσακχαρίτη) και το ένζυμο BLS (*Brucella* lumazine synthase) της *Brucella*, εξωκυτταρικά, ενεργοποιώντας τελικά την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων .
- ο **TLR9**, ενδοκυτταρικά, αναγνωρίζει ως προσδέτη το DNA της *Brucella*, και τελικά μέσω MyD88 οδηγεί σε παραγωγή IL-12.



Εικ.4: Τα σηματοδοτικά μονοπάτια του TLR9. Με πράσινο χρώμα, συνδεδεμένη με τον TLR9, διακρίνεται η MyD88.

Από τους παραπάνω TLRs εκείνος που διαδραματίζει τον σημαντικότερο ρόλο κατά τη διάρκεια της λοίμωξης είναι ο **TLR9**. Ο TLR9 – όπως και οι συγγενικοί του TLR3, TLR7 και TLR8- βρίσκεται στο ενδόσωμα με την TIR πρωτεϊνική περιοχή του εκτεθειμένη προς την πλευρά του κυτταροπλάσματος και απαιτεί την ενδοκυττάρωση του προσδέτη, για την ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών που περιλαμβάνουν ρυθμιστικούς (μεταγραφικούς) παράγοντες ιντερφερονών (IRFs) και την παραγωγή IFN τύπου α/β, προκειμένου να προκαλέσει την ενεργοποίηση του κυττάρου (Wagner, 2004),(Εικ.4).

Έχει δειχθεί ότι το DNA της *Brucella* (προσδέτης του TLR9) μαζί με HKBa (Heat-killed *Brucella abortus*), δηλαδή βακτήρια νεκρά μετά από θέρμανση, κατευθύνουν την ανοσοαπόκριση τύπου **T_{H1}** με τρόπο TLR9-εξαρτώμενο. Τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα **T_{H1}** παράγουν IFN-γ, IL-2, IL-12, και TNF-β με σκοπό να προάγουν την καταπολέμηση της λοίμωξης. Επιπροσθέτως, σε knock out ποντίκια για τον TLR9 παρατηρήθηκε μειωμένη παραγωγή IL-12 από τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα, εύρημα που συνάδει με τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα.

Όσον αφορά στην πρωτεΐνη **MyD88**, τα πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν επίσης έναν ρόλο-κλειδί στην αντιμετώπιση της λοίμωξης. Σε knock out ποντίκια για την MyD88 παρατηρήθηκε μειωμένη ελαγωγή της IL-12 και του TNF-α σε μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα μετά από διέγερση με HKBa, όπως επίσης και ελαττωματική ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων. Επίσης, μακροφάγα από knock out ποντίκια για την MyD88 που εκτέθηκαν σε *Brucella* παρουσίασαν μειωμένα επίπεδα των φλεγμονωδών κυτοκινών RANTES (CCCL5), MCP-1 (CCL2), MIP-1 α (CCL) και του NO.

Σε σύμπνοια με τα παραπάνω ευρήματα, αναφέρθηκε η ανάμιξη της MyD88 στην ανάπτυξη των κυττάρων που παράγουν IFN-γ και iNOS. Πράγματι, η MyD88-εξαρτώμενη σηματοδότηση είναι απαραίτητη για τα T-κύτταρα που παράγουν IFN-γ, αφού αυτό επιβεβαιώθηκε με την παρατήρηση έλλειψης παραγωγής IFN-γ σε knock out κύτταρα για την MyD88, από λεμφαδένα ποντικού μολυσμένου με *B. abortus*.

Συμπερασματικά λοιπόν, η T_{H1} απόκριση που επάγεται κατά την λοίμωξη με *B. abortus* ρυθμίζεται μέσω ενός MyD88-εξαρτώμενου μονοπατιού. Επίσης, in vivo, τα knock out ποντίκια για την MyD88 παρουσίασαν επιδείνωση της βρουκέλλωσης, γεγονός που καθιστά τον συγκεκριμένο γενότυπο υποψήφιο ως ευαίσθητο στην *Brucella*. Η IL-12 φάνηκε να παίζει σημαντικό ρόλο σε αυτή την ευαισθησία καθώς η θεραπεία των ποντικών με ανασυνδυασμένη IL-12 ενισχύει τελικά την ανθεκτικότητα των knock out ζώων για την MyD88 κατά της *Brucella*.

Ανακεφαλαιώνοντας τα έως τώρα δεδομένα: η επαγωγή κυτοκινών από HKBa είναι MyD88-εξαρτώμενη και το DNA της *Brucella* δεσμεύεται από τον TLR9 στο φαγόσωμα, ενώ η επαγωγή της ανοσοαπόκρισης από HKBa in vitro είναι μειωμένη σε knock out ποντίκια για τον TLR9 και απουσιάζει σε knock out ποντίκια για την MyD88, εκ των οποίων τα δεύτερα παρουσιάζουν ευαισθησία στην λοίμωξη από *Brucella*.

Δομή και λειτουργικές περιοχές TLR9

Λόγω της ιδιαίτερης σημασίας του **TLR9** στην άμυνα κατά της *Brucella* αναλύονται στη συνέχεια κάποιες ιδιαιτερότητες που παρουσιάζει στη δομή του. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι περιοχές ECD των TLRs περιέχουν 19-25 συνεχόμενα αντίγραφα ενός μοτίβου LRR καθώς και παρεμβλλόμενες στις LRRs αλληλουχίες, που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αναγνώριση και την πρόσδεση των βακτηριακών PAMPs. Στον TLR9, καθώς και στους συγγενικούς του TLR7 και TLR8, παρατηρούνται κάποια μοτίβα LRRs που διαφέρουν σημαντικά από τις συντηρημένες αλληλουχίες LRR που συναντώνται συνήθως σε TLRs.

Πιο συγκεκριμένα, στον ποντικό, οι LRR2, -5, -8 και -11 περιέχουν μακριές παρεμβλλόμενες αλληλουχίες στη θέση 10 μετά το κατάλοιπο Asn της συντηρημένης αλληλουχίας, και στην LRR20 υπάρχει ένθεση μετά την θέση 15. Η LRR8 περιέχει μια ένθεση 16 καταλοίπων που περιέχει 2 μοτίβα CXXC τα οποία χωρίζονται από 6 αμινοξικά κατάλοιπα.

Ένα παρόμοιο μοτίβο έχει ταυτοποιηθεί στην περιοχή σύνδεσης του προσδέτη σε μια πρωτεΐνη που χρησιμοποιεί ένα κατιόν ψευδαργύρου και προσδένεται απευθείας σε μη μεθυλιωμένες αλληλουχίες CpG. Εφόσον και

ο TLR9 προσδένει αλληλουχίες CpG, προτάθηκε ότι η συγκεκριμένη ένθεση στην LRR8 εμπλέκεται άμεσα στην πρόσδεση των PAMPs (Bell *et al*, 2003). Επιπροσθέτως, το γεγονός ότι η ένθεση της LRR8 βρίσκεται αμέσως μετά την Asn της συντηρημένης αλληλουχίας, τοποθετεί την ένθεση αυτή κοντά στο β-πτυχωτό φύλλο, και αφού οι ενθέσεις των LRR2, -5 και -11 εντοπίζονται σε παρόμοιες θέσεις, τότε πιθανότατα όλες μαζί δημιουργούν μια θέση πρόσδεσης για DNA.

Η σημασία των LRRs και των ενθέσεων για την λειτουργικότητα του TLR9, υποστηρίζεται και από τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά από πειράματα αφαίρεσης των παραπάνω αλληλουχιών σε ποντίκια.

Μετά από αφαίρεση οποιασδήποτε LRR του ECD του TLR9, είτε αυτή περιελάμβανε ένθεση είτε όχι, παρατηρήθηκε απώλεια λειτουργίας του υποδοχέα. Ακολούθησε δοκιμή με αφαίρεση εκείνων μόνο των αμινοξέων που δεν συμφωνούν με τη συντηρημένη αλληλουχία και ακόλουθη διέγερση με ολιγονουκλεοτίδια CpG, και παρατηρήθηκε απώλεια λειτουργίας του υποδοχέα και αδυναμία πρόσδεσης CpG στα μεταλλάγματα που δεν διέθεταν τις ενθέσεις στις LRR-2, -5 και -8. Τα μεταλλάγματα αυτά παρουσίασαν επικρατή χαρακτήρα όταν εκφράστηκαν μαζί με τα αντίστοιχα WT γονίδια, με αρνητικές συνέπειες εις βάρος του WT φαινότυπου (Peter *et al*, 2009).

Εκτός από τις LRRs του ECD, φαίνεται πως άλλη μια περιοχή του αμινοτελικού άκρου του TLR9 είναι εξέχουσας σημασίας για την διέγερση και τη λειτουργία του υποδοχέα. Λόγω παρουσίας αντίστοιχου τομέα στον συγγενικό TLR3, ο οποίος περιλαμβάνει δυο συντηρημένες ιστιδίνες (H39, H60) και εμπλέκεται στην πρόσδεση σκελετού ριβόζης, εξετάστηκαν θετικά φορτισμένες περιοχές του αμινοτελικού άκρου του TLR9 ως θέσεις πρόσδεσης DNA. Οι περιοχές αυτές του TLR9 είναι πιθανό να φέρουν θετικό φορτίο στο ελαφρώς όξινο pH του ενδοσώματος, γεγονός που τις καθιστά συμπληρωματικές προς τον αρνητικά φορτισμένο σκελετό του DNA.

Τα θετικά φορτισμένα αμινοξικά κατάλοιπα K51 και R74 δημιουργούν μια περιοχή με θετικό φορτίο, παρακείμενη της ένθεσης στην LRR2 και σε στενή γειτνίαση με μια ακόμη φορτισμένη περιοχή που περιλαμβάνει τρεις συντηρημένες ιστιδίνες (H76, H77, H79) στα LRR-NT

και LRR1 του TLR9 . Δοκιμές με σημειακές μεταλλάξεις στις παραπάνω θέσεις έδειξαν απώλεια λειτουργίας του υποδοχέα και αδυναμία πρόσδεσης σε ολιγονουκλεοτίδια CpG στα μεταλλάγματα K51M και R74M, όπου τα φορτισμένα κατάλοιπα αντικαταστάθηκαν από την αφόρτιστη μεθειονίνη. Η αντικατάσταση των H76, H77, H79 δεν είχε κάποια συνέπεια στην ικανότητα πρόσδεσης ή την λειτουργικότητα του TLR9 (Peter et al, 2009).

Συμπερασματικά , προκύπτει ότι τόσο οι ενθέσεις στις LRR-2, -5 , και- 8 όσο και η συγκεκριμένη θετικά φορτισμένη περιοχή του αμινοτελικού άκρου (με τα αμινοξικά κατάλοιπα K51 και R74) εμπλέκονται στην αναγνώριση του προσδέτη και είναι απαραίτητες για την πρόσδεση CpG DNA στον TLR9 και την ενεργοποίηση του μέσω αυτών.

Τα δεδομένα αυτά αντιτίθενται στα δημοσιευμένα αποτελέσματα ερευνών που αναφέρουν ότι εντός του ενδοσώματος συντελείται αποκοπή του αμινοτελικού τμήματος ECD του TLR9 (μέχρι και το LRR15) για την δημιουργία λειτουργικού υποδοχέα, οπότε το C-τελικό τμήμα που προκύπτει επαρκεί για την ενεργοποίηση του υποδοχέα (Ewald *et al*, 2008, Park *et al* 2008).

Σε όλα τα μεταλλάγματα στα οποία αφαιρέθηκαν τμήματα του ECD ανιχνεύθηκε και η παρουσία του «κομμένου» τμήματος, οπότε η απώλεια λειτουργίας που παρατηρήθηκε δεν οφείλεται σε πιθανή παρεμπόδιση της αποκοπής του. Επίσης, δεν επηρεάστηκε ούτε η έκφραση ούτε ο διμερισμός των υποδοχέων από την απουσία των τμημάτων που αφαιρέθηκαν, οπότε τελικά η παρουσία των εν λόγω τμημάτων είναι προφανώς υπεύθυνη για την ενεργοποίηση μέσω πρόσδεσης αλληλουχιών CpG στον TLR9 (Peter *et al*, 2009).

Είναι δεδομένο ότι τμήμα του ECD του TLR9 αποκόπτεται σε κάποια χρονική στιγμή, και ότι το κομμάτι που προκύπτει είναι σημαντικό για την ενεργοποίηση του υποδοχέα αλλά είναι προφανής και η απαραίτητη παρουσία του ECD. Ίσως μετά την αποκοπή του το C-τελικό τμήμα παραμένει συνδεδεμένο με τον υπόλοιπο TLR, όπως απεδείχθη πρόσφατα για τον Toll στην *Drosophila* (Weber *et al*, 2005), και αυτό το σύμπλοκο να παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια για το CpG DNA.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η τεχνική PCR χρησιμοποιείται σήμερα σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών που έχουν σαν βάση τον ειδικό πολλαπλασιασμό (ενίσχυση) μιας αλληλουχίας DNA. Η PCR είναι τόσο ευαίσθητη τεχνική που μπορεί να πολλαπλασιάσει μια αλληλουχία από ένα μόνο μόριο DNA. Ο πολλαπλασιασμός μοναδικών γονιδίων μέσα από πολύπλοκες γονιδιωματικές αλληλουχίες αποτελεί μια διαδικασία ρουτίνας. Με την ανακάλυψη των DNA πολυμερασών που έχουν μεγάλη θερμοσταθερότητα και την αυτοματοποίηση της τεχνικής PCR, εκτός των ερευνητικών εφαρμογών, πληθώρα άλλων διαγνωστικών εφαρμογών βασίζονται σε αυτή την τεχνική όπως: η αναγνώριση ιών και βακτηρίων, η ταυτοποίηση οικογενειακών σχέσεων αξιοποιώντας πολυμορφικές αλληλουχίες DNA, η αναγνώριση θυμάτων και ενόχων ακόμα και για εγκλήματα που διεπράχθησαν πριν από δεκαετίες ή εκατονταετίες, κ.ά.

Ανάλυση SSCP

Η SSCP ανάλυση περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Orita και τους συνεργάτες του (1989). Η γενική ιδέα της τεχνικής είναι η αποδιάταξη μικρών προϊόντων PCR και η ηλεκτροφόρηση τους σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Καθώς τα προϊόντα PCR μετακινούνται διαμέσου του πηκτώματος επανακτούν τη δευτεροταγή τους δομή που εξαρτάται από την αλληλουχία (όπως και οι δευτεροταγείς δομές του RNA). Η κινητικότητα των μονόκλωνων προϊόντων της PCR εξαρτάται από τη δευτεροταγή τους δομή. Επομένως, τα προϊόντα PCR που περιέχουν διαφορές στην αλληλουχία θα έχουν διαφορετική κινητικότητα.

Το κύριο πλεονέκτημα της ανάλυσης SSCP είναι ότι πολλά ξεχωριστά προϊόντα PCR μπορούν να ελεγχθούν για διαφοροποιήσεις ταυτόχρονα. Η ανάλυση SSCP εφαρμόζεται για να μειωθεί ο αριθμός των αλληλουχήσεων που απαιτούνται για τον προσδιορισμό νέων αλληλομόρφων σε γενετικούς

τόπους ή για την καλύτερη εκτίμηση των αλληλομορφικών συχνοτήτων σε πληθυσμούς. Υπάρχουν επίσης και άλλες εφαρμογές της ανάλυσης SSCP. Πρώτον, η ανάλυση SSCP μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο των PCR προϊόντων γονιδίων που πρόκειται να αλληλουχηθούν για φυλογενετικές αναλύσεις. Ο έλεγχος αυτός προσδιορίζει αν το γονίδιο περιέχει αρκετούς πολυμορφισμούς, που εντοπίζονται οι πολυμορφισμοί αυτοί, ποιο είναι το επίπεδο της ενδοειδικής ποικιλότητας και αν υπάρχει πολυμορφισμός μεταξύ γονιδίων πολλαπλών αντιγράφων στα άτομα. Επιπλέον, η μέθοδος SSCP είναι κατάλληλη για την άντληση πληροφοριών σχετικά με τα επίπεδα των πολυμορφισμών σε πυρηνικούς γενετικούς τόπους.

Υπάρχουν όμως και δύο μειονεκτήματα στη μέθοδο SSCP. Πρώτον, οι διαφορές στην κινητικότητα δε σχετίζονται με τον αριθμό των διαφορών στην αλληλουχία. Επομένως, η μόνη πληροφορία που μπορεί να αντληθεί είναι κατά πόσο τα ενισχυμένα τμήματα είναι πανομοιότυπα ή διαφορετικά. Δεύτερον, το βέλτιστο μέγεθος των ενισχυμένων τμημάτων για την ανίχνευση των περισσότερων σημειακών μεταλλάξεων είναι ιδιαίτερα μικρό, περίπου 200bp.

ΣΚΟΠΟΣ

Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι ο υποδοχέας TLR9 και η πρωτεΐνη MyD88 διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα κατά της *Brucella abortus*, που προκαλεί την βρουκέλλωση των βοοειδών. Ο TLR9 προάγει την ενδοκυτταρική σηματοδότηση μέσω της MyD88, ενώ είναι γνωστό ότι τα δύο γονίδια βρίσκονται σε κοντινή απόσταση, τόσο στο χρωμόσωμα 3 του ανθρώπου όσο και στο χρωμόσωμα 22 του ταύρου (*Bos taurus*). Το γεγονός ότι τα δύο γονίδια είναι στενά συνδεδεμένα υποδεικνύει την ύπαρξη ενός συγκεκριμένου απλότυπου που συνδέεται με την εκδήλωση προδιάθεσης για την ασθένεια.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι καταρχάς να εξακριβωθεί η ύπαρξη πολυμορφισμών στους δύο αυτούς γονιδιακούς τόπους στο πρόβατο (*Ovis aries*), ακολούθως να ταυτοποιηθούν οι πολυμορφισμοί αυτοί και τελικά να συσχετιστούν συγκεκριμένα αλληλόμορφα με την εκδήλωση προδιάθεσης ή ανθεκτικότητας στην *B.abortus*. Για το σκοπό αυτό, εφαρμόζεται απομόνωση γεωμικού DNA, ενίσχυση των υπό μελέτη γονιδιακών τμημάτων με PCR, και κατόπιν SSCP και αλληλούχηση για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των πολυμορφισμών.

Μελλοντικά, αποτελέσματα τέτοιων μελετών είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν για την περαιτέρω γενετική ταυτοποίηση πληθυσμών προβάτων ανάλογα με το αν παρουσιάζουν προδιάθεση ή ανθεκτικότητα για την βρουκέλλωση από *B.abortus*.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Δείγματα

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 129 άτομα *Ovis aries* από τις φυλές:

- Φριζάρτα (κωδικός AA, από AA1 έως AA33), από κοπάδια της περιοχής της Άρτας.
- Μπούτσικα με κόκκινο κεφάλι (κωδικός KK, από KK1 έως KK10) και Μπούτσικα με λευκό κεφάλι (κωδικός EM, από EM1 έως EM48) από τα Τρίκαλα.
- Προγονικά άτομα της φυλής Μπούτσικα από την Ιταλία (κωδικός IT, από IT1 έως IT38)

Για τη μελέτη του γονιδίου *TLR9* χρησιμοποιήθηκε DNA από 116 άτομα και για τη μελέτη του *MyD88* χρησιμοποιήθηκε DNA από 102 άτομα, εκ των οποίων τα 93 ήταν κοινά.

2. Απομόνωση του DNA

Η μέθοδος απομόνωσης που εφαρμόστηκε περιλαμβάνει αρχικά προσθήκη SDS (ιονικό απορρυπαντικό), το οποίο συμβάλλει στη διάσπαση της πυρηνικής μεμβράνης και στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών, προστατεύοντας έτσι το DNA από τις νουκλεάσες και προσθήκη πρωτεϊνάσης K για την πέψη των πρωτεϊνών. Ακολουθώς, χρησιμοποιείται φαινόλη για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών και τον διαχωρισμό λιπιδίων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Το διάλυμα φαινόλης που χρησιμοποιείται είναι εξισορροπημένο σε pH>7 ώστε το DNA να κατανέμεται στην υπερκείμενη υδατική φάση. Η μετέπειτα προσθήκη του χλωροφορμίου έχει σκοπό τον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων λόγω μεγάλης πυκνότητας, ενώ συμβάλλει επίσης στη μετουσίωση των πρωτεϊνών και την απομάκρυνση της διαλυμένης φαινόλης από την υδατική φάση. Επιπλέον, προστίθεται και ισοαμυλική αλκοόλη η οποία σταθεροποιεί το χλωροφόρμιο. Η κατακρήμνιση του DNA γίνεται με ισοπροπανόλη, και ακολουθεί πλύση με αιθανόλη 70%, καθώς το DNA είναι αδιάλυτο στους συγκεκριμένους οργανικούς διαλύτες.

Για κάθε απομόνωση γενωμικού DNA χρησιμοποιήθηκε 0,5 ml αίματος από τα δείγματα, το οποίο αποθηκεύθηκε σε σωληνάκια με EDTA, που είναι αντιπηκτικό, στους -80°C. Ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο:

1. Ξεπαγώνουμε τα δείγματα και σε 0,5 ml από κάθε δείγμα προσθέτουμε 1ml διαλύματος 1x SSC (0,15M NaCl, 0,015M κιτρικό άλας του νατρίου, pH 7).

2. Αναδεύουμε έντονα (vortex), φυγοκεντρούμε σε θερμοκρασία δωματίου (RT) στις 13.000 rpm για 3 min. αδειάζουμε το υπερκείμενο, προσθέτουμε εκ νέου 1ml 1x SSC και επαναλαμβάνουμε τη φυγοκέντρηση .

3. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο, προσθέτουμε 500μl 0,2M οξικού νατρίου, 50 μl SDS 5% και 5μl πρωτεϊνάση K (20 mg/ml) και αναδεύουμε έντονα (vortex).

4. Επωάζουμε τα δείγματα για 1 ώρα στους 55 °C με συχνή ανάδευση του δείγματος.

5. Εκχυλίζουμε με 0,5 ml φαινόλη και 0,5ml χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1). Αναδεύουμε έντονα (vortex), φυγοκεντρούμε στις 13.000 rpm για 10 min στους 4°C μεταφέρουμε την υπερκείμενη υδατική φάση σε νέο σωλήνα erppendorf και επαναλαμβάνουμε με 1ml χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1).

6. Μεταφέρουμε την υπερκείμενη υδατική φάση σε νέο σωλήνα erppendorf, προσθέτουμε 1ml παγωμένη ισοπροπανόλη, αναδεύουμε έντονα και επωάζουμε τα δείγματα για 20 min στους -20 °C.

7. Η κατακρήμνιση γίνεται με φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 20 min στους 4°C .

8. Απομακρύνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο και ξεπλένουμε το ίζημα με παγωμένη αιθανόλη 70%.

9. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 rpm για 5 min στους 4°C, απομακρύνουμε το υπερκείμενο, ξηραίνουμε το ίζημα με επώαση στους 37°C και επαναδιαλύουμε το ίζημα του DNA σε 100μl ddH₂O.

Αποθηκεύουμε το απομονωμένο DNA στους 4°C για άμεση χρήση ή στους -20°C για μελλοντική χρήση.

3. Ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος DNA

Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία απομόνωσης του DNA, τα δείγματα ελέγχονται ποιοτικά και ποσοτικά με φωτομέτρηση και με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v, αντίστοιχα.

Η ποσοτικοποίηση με φωτομέτρηση πραγματοποιείται μετά από αραιώση 1μl δείγματος σε 49μl ddH₂O στα 260nm με δεδομένο ότι OD=1 αντιστοιχεί σε 50 μg ανά ml. Ο λόγος της τιμής της απορρόφησης στα 260nm προς την αντίστοιχη τιμή στα 280nm είναι ένας δείκτης καθαρότητας του DNA, ο οποίος αναμένεται να έχει τιμή περίπου 2 σε δείγματα υψηλής καθαρότητας. Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης περιγράφεται παρακάτω, ενώ με ηλεκτροφόρηση ελέγχονται επίσης και τα προϊόντα της PCR.

4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Με PCR ενισχύθηκαν τα τμήματα των γονιδίων *TLR9* και *MyD88* που αντιστοιχούν στα νουκλεοτίδια 1343-1756 και 470-738 του cDNA στις αλληλουχίες NM_001011555.1 και NM_001166183.1 αντίστοιχα του *Ovis aries*.

Για την PCR, οι εκκινητές σχεδιάστηκαν βάσει των αλληλουχιών NM_001011555.1 και NM_001166183.1 (Πίνακας 1)

Πίν.1 : Οι αλληλουχίες των εκκινητών για την PCR.

Εκκινητής	Αλληλουχία
TLR9_F1 (Forward)	5'-TTC GTG GAC CTG TCG GAC-3'
TLR9_R1 (Reverse)	5'-CTG GCT GTT GTA GCT GAG-3'
MyD88_F2 (Forward)	5'-AGC CTG AGT ATT TTG ATGC-3'
MyD88_R2 (Reverse)	5'-ACC TGG AGA GAG GCT GAG-3'

Η διαδικασία της PCR είναι η εξής:

Ένα δείγμα DNA αναμειγνύεται με τα τέσσερα δεοξυριβονουκλεοτίδια, τα δύο εναρκτήρια ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές, primers) και την Taq

πολυμεράση με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και μαγνήσιο. Το δείγμα θερμαίνεται στους 94-95°C για να αποδιαταχθεί το DNA και ακολούθως στους 50-65°C για να υβριδοποιηθούν οι εκκινητές με τις αλυσίδες του DNA. Ακολουθεί πολυμερισμός στους 72°C –ο χρόνος εξαρτάται από το μήκος του προϊόντος-και τα παραπάνω βήματα επαναλαμβάνονται πολλές φορές έως ότου συντεθεί αρκετό προϊόν. Η αντίδραση είναι εκθετική, δηλαδή ένα μόριο DNA δίνει μετά από 30 επαναλήψεις της αντίδρασης 2^{30} (περίπου 10^9) μόρια DNA.

Η θερμοκρασία και ο χρόνος που χρειάζεται για υβριδοποίηση των εκκινητών εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους στην αντίδραση, το μήκος και την αλληλουχία των βάσεων τους. Αυξάνοντας τη θερμοκρασία της υβριδοποίησης, αυξάνεται η ειδικότητα του τελικού προϊόντος καθώς έτσι περιορίζεται η υβριδοποίηση των εκκινητών στις περιοχές του DNA με τη μέγιστη συμπληρωματικότητα.

Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την PCR περιγράφεται στον Πίνακα 2.

Πιν.2: Τα συστατικά της PCR.

Συστατικά	Ποσότητα
Εκμαγείο DNA	0,5μl (100-300ng)
dNTPs (10mM το καθένα)	1 μl
MgCl ₂ (50mM)	2 μl
10x NH ₄ ρυθμιστικό διάλυμα	5 μl
Εκκινητής Fw 50pmol/μl	1 μl
Εκκινητής Rv 50pmol/μl	1 μl
Taq DNA Polymerase 5 U/μl	0,2 μl
ddH ₂ O	39,3 μl
Συνολικός όγκος	50 μl

Επιπλέον, προετοιμάστηκε και αρνητικός μάρτυρας αποτελούμενος από όλα τα παραπάνω συστατικά εκτός του DNA. Ο αρνητικός έλεγχος χρησιμοποιείται για να αποκλειστεί το ενδεχόμενο μόλυνσης, αφού μπορεί να προκύψουν ψευδώς θετικά ή αναξιόπιστα αποτελέσματα σε μια τέτοια

περίπτωση. Η μόλυνση μπορεί να προέλθει από DNA σε ένα ή περισσότερα εκ των συστατικών, ή από απροσεξία κατά τη διαδικασία.

Οι συνθήκες ενίσχυσης του επιθυμητού τμήματος του γονιδίου *TLR9* και του *MyD88* είναι:

Αρχική αποδιάταξη : 95° C για 4 min

Αποδιάταξη: 95 ° C για 40 sec

Υβριδοποίηση εκκινητών : 59 ° C για 50 sec

Επιμήκυνση: 72 ° C για 40 sec

Τελική επιμήκυνση: 72 ° C για 10 min

} 35 κύκλοι

5. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό τμημάτων DNA διαφορετικού μεγέθους. Χρησιμοποιήθηκε για έλεγχο του γενωμικού DNA μετά την απομόνωση, καθώς και για την ποσοτικοποίηση και τον έλεγχο της ποιότητας των προϊόντων PCR. Βασίζεται στην διαφορετική ταχύτητα με την οποία μετακινούνται τα τμήματα DNA διαμέσου του πηκτώματος υπό την εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης, ανάλογα με το μέγεθός τους. Το μέγεθος των τμημάτων εκτιμάται με τη χρήση μάρτυρα τμημάτων DNA γνωστού μεγέθους και ποσότητας (ladder). Η συγκέντρωση του πηκτώματος διαφοροποιείται ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA που πρέπει να διαχωριστούν. Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την τεχνική αυτή είναι τα ακόλουθα:

TAE 50x (500ml): Tris Base 121gr Acetic Acid 28,5ml, EDTA 0,5M 50ml, ddH₂O έως τα 500ml,

Loading buffer 6x (10ml): Bromophenol blue 1% w/v 1ml, TBE 20x 0,5ml, Glycerol 5ml, ddH₂O έως τα 10ml

Αρχικά παρασκευάζουμε διάλυμα TAE 1x αραιώνοντας το πυκνό διάλυμα 50x. Για την προετοιμασία του πηκτώματος διαλύουμε 0,6gr ή 0,3gr αγαρόζης σε 30ml TAE 1x (τελική συγκέντρωση 2% και 1% αντίστοιχα w/v) με θέρμανση και προσθέτουμε 3μl βρωμιούχου αιθιδίου (10mg/ml). Το βρωμιούχο αιθίδιο συνδέεται με το DNA και το καθιστά ορατό υπό υπεριώδες φως. Το πήκτωμα τοποθετείται σε ειδικό καλούπι όπου και πολυμερίζεται.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων απαιτείται η προσθήκη loading buffer σε αυτά. Σε 5μl PCR προϊόντος (10% του συνολικού), με συγκέντρωση DNA περίπου 40 ng/μl, προστίθενται 3μl loading buffer. Μαζί με τα δείγματα ηλεκτροφορείται και ένας μάρτυρας μεγέθους τμημάτων DNA (ladder), όπως επίσης και ο αρνητικός μάρτυρας. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 100 volts και ακολουθεί παρατήρηση του πηκτώματος με λάμπα υπεριώδους φωτός.

6. Ανάλυση SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

Η ανάλυση SSCP βασίζεται στο διαχωρισμό μονόκλωνων τμημάτων DNA βάσει των διαφορών της κινητικότητάς τους στο πήκτωμα, με διακριτική ικανότητα ενός νουκλεοτιδίου. Η ανάλυση SSCP αποτελείται από τρία στάδια: την αποδιάταξη των προϊόντων της PCR, την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε μη αποδιατακτικές συνθήκες και τη χρώση της πηκτής για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων.

6.A. Αποδιάταξη προϊόντων PCR

Σκοπός της αποδιάταξης είναι η μετατροπή των δίκλωνων τμημάτων DNA σε μονόκλωνα. Για την αποδιάταξη των μορίων DNA χρησιμοποιήθηκε αποδιατακτικό διάλυμα : 95% formamide, 0,05% Bromophenol blue, 0,05% Xylene Cyanol, 10mM NaOH. Ειδικότερα, σε 4-6μl PCR προϊόντος (ανάλογα με την συγκέντρωσή του) συνολικής ποσότητας περίπου 160 ng , προστίθενται 10μl αποδιατακτικό διάλυμα και τα δείγματα επωάζονται για 6 min στους 96°C. Ακολούθως τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο όπου διατηρούνται σε μονόκλωνη κατάσταση, έως ότου ηλεκτροφορηθούν στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

6.B. Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης

Για την παρασκευή των πηκτωμάτων πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα διαλύματα :

Διάλυμα ακρυλαμίδης 38,5% (200ml): Ακρυλαμίδα 75gr, Bis-acrylamide (N,N-μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδιο) 2gr, ddH₂O έως τα 200ml

TBE 10x (2lt): Tris Base (τρικς (υδροξυμεθύλ) αμινομεθάνιο) 121 gr, Βορικό οξύ 81,5 gr, EDTA 0,5M 80ml , ddH₂O έως τα 2lt

Glycerol 50% v/v: αραιώση με H₂O πυκνού διαλύματος

APS 20% w/v: διάλυση 2gr υπερθειϊκού αμμωνίου σε H₂O σε τελικό όγκο 10ml

TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diamine)

Στην μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα ακρυλαμίδης συγκέντρωσης 8%. Οι ποσότητες των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης 8% αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Διαλύματα	Ποσότητα
Διάλυμα ακρυλαμίδης 38,5%	10,6ml
Glycerol 50%	8,3ml
TBE 10x	4,2ml
TEMED	66μl
APS 20%	375μl
H ₂ O	Έως τα 62,5ml (τελικός όγκος)

Ακολουθεί ανάμιξη των συστατικών και τοποθέτηση σε καλούπι. Μετά τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης, ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των αποδιατεταγμένων δειγμάτων με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0,5x. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή τάσης 230 volts σε RT, για 20 ώρες.

6.Γ. Χρώση των πηκτωμάτων πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο (Silver Staining)

Για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης γίνεται χρώση των πηκτωμάτων με νιτρικό άργυρο. Η τεχνική στηρίζεται στην

σύνδεση του αργύρου με το DNA και την ακόλουθη αντίδραση με την φορμαλδεΰδη, παρουσία βάσης. Ως αποτέλεσμα, οι ζωνώσεις του DNA εμφανίζονται με καφέ χρώμα σε κίτρινο φόντο.

Για τη χρώση χρησιμοποιήθηκαν τα εξής διαλύματα :

Διάλυμα 1 (400ml) : Αιθανόλη 8ml, οξικό οξύ 0,5ml, ddH₂O ως τα 400ml

Διάλυμα 2 (200ml): Διάλυμα νιτρικού αργύρου(AgNO₃) 1gr/lt

Διάλυμα 3 (200ml): Υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) 3g, βοροϋδρίδιο του νατρίου(NaBH₄) 0,01g, φορμαλδεΰδη 1ml, ddH₂O έως τα 200ml

Η διαδικασία έχει ως εξής: Στο πρώτο στάδιο της χρώσης, το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε 200ml του διαλύματος 1 και αναδεύεται για 3 min. Το διάλυμα 1 απομακρύνεται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Ακολουθεί πλύση του πηκτώματος με απεσταγμένο νερό για 1 min. Στο δεύτερο στάδιο προστίθεται το διάλυμα νιτρικού αργύρου και το πήκτωμα αναδεύεται για 20 min. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται 2 πλύσεις με απεσταγμένο νερό, διάρκειας 1 min η κάθε μια. Στο τρίτο στάδιο προστίθεται το διάλυμα 3 και πραγματοποιείται ανάδευση μέχρι την εμφάνιση ορατών ζωνών στο πήκτωμα.

7. Αλληλούχηση DNA

Για την έλεγχο ύπαρξης πολυμορφισμών στα υπό μελέτη γονίδια πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση του DNA. Τα προϊόντα PCR καθαρίστηκαν με ειδικές κολώνες (Qiagen) βάσει των οδηγιών της εταιρείας και στάλθηκαν στην εταιρεία MACROGEN για να πραγματοποιηθεί η αλληλούχηση. Η τελική ποσότητα του προϊόντος της PCR που πρόεκυψε μετά τον καθαρισμό και στάλθηκε για αλληλούχηση είναι περίπου 1μg για κάθε δείγμα. Για το σκοπό αυτό στάλθηκαν δείγματα από άτομα αντιπροσωπευτικά των προτύπων που προέκυψαν για κάθε γονίδιο (βλ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1.Ενίσχυση τμημάτων των γονιδίων *TLR9* και *MyD88* σε άτομα *Ovis aries* με PCR

Στην μελέτη αυτή διερευνήθηκε η ύπαρξη πολυμορφισμών στα γονίδια *TLR9* και *MyD88* σε 129 άτομα *Ovis aries*, που προέρχονται από τρεις διαφορετικές φυλές: Φριζάρτα, Μπούτσικα (με λευκό και με κόκκινο κεφάλι) και άτομα προγονικά της φυλής των Μπούτσικα.

TLR9

Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε γενωμικό DNA που είχε απομονωθεί από αίμα (διπλωματική εργασία Α. Κόκκαλη, Μοριακή ανάλυση του γονιδίου *DRB1* του MHC στο είδος *Ovis aries*, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2008). Στη συνέχεια στα δείγματα πραγματοποιήθηκε PCR με τους εκκινητές *TLR9_F1* και *TLR9_R1*. Ειδικότερα, για το *TLR9*, ενισχύθηκε το τμήμα που αντιστοιχεί στα νουκλεοτίδια 1344-1757 bp της αλληλουχίας του cDNA του γονιδίου, το οποίο έχει συνολικό μήκος 3199 bp (*Ovis aries*, mRNA, NM_001011555, GenBank, www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank). Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του προϊόντος της PCR, μεγέθους 414 bp, καθώς και η αντίστοιχη αμινοξική αλληλουχία που προκύπτει από την μετάφρασή του (αμινοξέα 418-555 της αλληλουχίας NP_001011555.1), παρουσιάζεται στην Εικ.5.

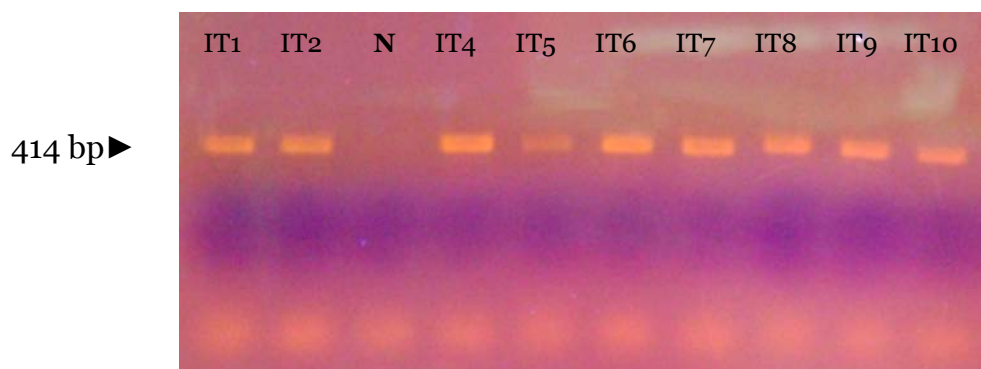
Όπως αναφέρθηκε και στην Εισαγωγή, η πρωτεΐνη *TLR9* του ανθρώπου (NP_059138.1) αποτελείται από 1032 αμινοξέα και φέρει 25 συνεχόμενες επαναλήψεις LRR ενώ μεταξύ του 14^{ου} και 15^{ου} LRR παρεμβάλλεται μία ενδιάμεση συνδετική περιοχή, που δεν εμφανίζει κάποιο συγκεκριμένο μοτίβο (Bell *et al*, 2003). Αντίστοιχα, η ορθόλογη πρωτεΐνη του *Ovis aries* (NP_001011555.1) αποτελείται από 1029 αμινοξέα και μέσω σύγκρισής της με την πρωτεΐνη του ανθρώπου, μπορούν να καθοριστούν οι συγκεκριμένες επαναλήψεις και σε αυτήν. Βάσει των παραπάνω, το προϊόν της PCR αντιστοιχεί στα νουκλεοτίδια που κωδικοποιούν μέρος της 14^{ης} επανάληψης LRR, όλη την ενδιάμεση περιοχή, τα LRR 15, 16 και 17 και μέρος του 18^{ου} LRR (Εικ.5)

Η επιλογή του τμήματος αυτού στηρίχθηκε στο γεγονός ότι, όπως αναφέρθηκε και στην Εισαγωγή, το αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης TLR9 απομακρύνεται με πρωτεόλυση, η οποία είναι απαραίτητη για την περαιτέρω σηματοδότηση, από το καρβοξυτελικό τμήμα, μέσω MyD88 (Park *et al* 2008, Ewald *et al* 2008). Το τμήμα στο οποίο εντοπίζεται η πιθανή θέση πρωτεόλυσης περιλαμβάνει τα αμινοξέα 378-475 της TLR9 του ανθρώπου, που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 377-473 της ορθόλογης πρωτεΐνης με πιθανότερο το τμήμα που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 441-470 του ανθρώπου (440-469 του *Ovis aries*) βάσει αλγορίθμων πρόβλεψης δευτεροταγούς δομής (Ewald *et al* 2008). Το τμήμα αυτό αποτελεί μέρος της συνδετικής περιοχής μεταξύ του LRR14 και LRR15 και φαίνεται να σχηματίζει έναν ευέλικτο βρόχο, ο οποίος θα μπορούσε να είναι εκτεθειμένος προς πρωτεόλυση. Έτσι, το προϊόν PCR σχεδιάστηκε ώστε να περιλαμβάνει αυτό το τμήμα και να εκτείνεται προς το 3' άκρο. Το μήκος του (414bp) περιορίστηκε επειδή ακολούθως θα εφαρμοζόταν ανάλυση SSCP η οποία, για μεγαλύτερα τμήματα, έχει περιορισμένη διακριτική ικανότητα. Σε επόμενη μελέτη, θα αναλυθεί και το υπόλοιπο τμήμα μέχρι και το 3' άκρο.

Ακολούθησε έλεγχος των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης, όπως φαίνεται ενδεικτικά στην Εικ.6.

ttcgtggacctgtcggacaaccgcatcagcggagctgcgaggccggtggccgcctcggg
F V D L S D N R I S G A A R P V A A L G
 gaggtggacagcgggggtggaagtctggcggtggcccaggggctcgtccaggcccgctg
 E V D S G V E V W R W P R G L A P G P L
 gccgccgtcagcgcgaaggacttcatgccaaagctgcaacctcaacttcaccttggacctg
 A A V S A K D F M P S C N **L N F T L D L**
 tcacggaacaacctggtgacgatccagcaggagatgtttaccgcctctccgcctccag
S R N N L V T I Q Q E M F T R L S **R L Q**
 tgcctgcgcctgagccacaacagcatctcgcaggcggttaatggctcgcagttcgtgccg
C L R L S H N S I S Q A V N G S Q F V P
 ctgaccgcctgcgagtgctcgacctgtcctacaacaagctggacctgtaccatgggccc
L T **R L R V L D L S Y N K L D L Y H G R**
 tcgttcacggagctgccgcagctggaggcactggac**ctcagctacaacagccag**
S F T E L **P Q L E A L D L S Y N S Q**

Εικ.5: Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του προϊόντος PCR του γονιδίου TLR9 βάσει της αλληλουχίας NM_001011555 και η αντίστοιχη αμινοξική αλληλουχία. Με υπογράμμιση, σημειώνονται οι θέσεις υβριδοποίησης των εκκινητών: ο εκκινητής TLR9_F1 υβριδοποιήθηκε με το τμήμα 1344-1361 bp της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και ο εκκινητής TLR9_R1 με το τμήμα 1740-1757 bp. Επίσης, με κίτρινο και μπλε χρώμα σημειώνονται οι επαναλήψεις LRR και με γκρι η ενδιάμεση συνδετική περιοχή (βλ. Εισαγωγή).



Εικ.6: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR για το γονίδιο TLR9. Οι κωδικοί που αναγράφονται αντιστοιχούν σε άτομα φυλής προγονικής των Μπούτσικα (βλ. Δείγματα), N: αρνητικός μάρτυρας.

MyD88

Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε γενωμικό DNA που είχε απομονωθεί από αίμα, όπως και για το *TLR9*. Στη συνέχεια στα δείγματα πραγματοποιήθηκε PCR με τους εκκινητές MyD88_F2 και MyD88_R2.

Η πρωτεΐνη MyD88 του ανθρώπου (NP_001166038.1) αποτελείται από 317 αμινοξέα και φέρει, μεταξύ άλλων, μια περιοχή DD (death domain) που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 48-118 και μια περιοχή TIR που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 173-317. Η ορθόλογη πρωτεΐνη στο *Ovis aries* (NP_001159655.1) έχει μήκος 296 αμινοξέα και μετά από σύγκριση με την πρωτεΐνη του ανθρώπου, είναι δυνατόν να καθοριστούν οι θέσεις των αντίστοιχων περιοχών και σε αυτήν. Πιο συγκεκριμένα η DD περιλαμβάνει τα αμινοξέα 35-105 και η TIR τα αμινοξέα 160-296. Όπως αναφέρθηκε και στην Εισαγωγή, η περιοχή TIR είναι υπεύθυνη για τις αλληλεπιδράσεις της MyD88 με τα υπόλοιπα συστατικά του σηματοδοτικού μονοπατιού που συντονίζει, άρα απολύτως απαραίτητη για την λειτουργία της πρωτεΐνης.

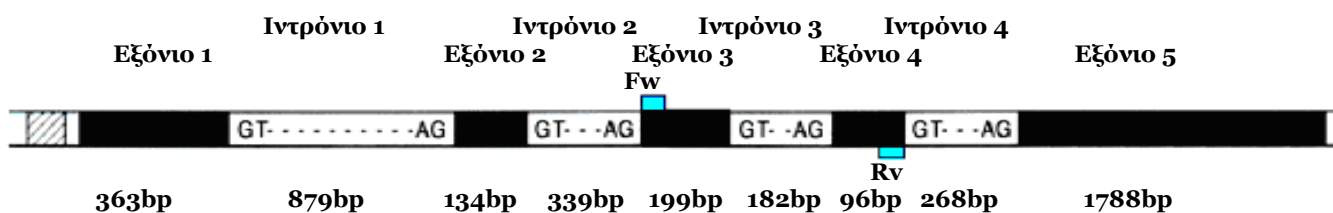
Βάσει των παραπάνω, το προϊόν της PCR σχεδιάστηκε ώστε να περιλαμβάνει τα νουκλεοτίδια που κωδικοποιούν το μεγαλύτερο μέρος της περιοχής TIR, από το αμινοξύ 158 έως και το 246 (NP_001159655.1) όπως φαίνεται στην Εικ.7. Βάσει της αλληλουχίας NM_001166183.1 ο εκκινητής MyD88_F2 υβριδοποιείται με το τμήμα 470-488 bp της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και ο εκκινητής MyD88_R2 με το τμήμα 721-738 bp.

```
aagcctgagtattttgatgccttcatctgctactgccccagcgatattgagtttgtccat
K P E Y F D A F I C Y C P S D I E F V H
gagatgatccggcagctggaacagacaaactatcggctgaaattgtgctgtctgaccgt
E M I R Q L E Q T N Y R L K L C V S D R
gacgtcctgcctggcacctgtgtctgggtccatcgccagtgaaactcattgagaagaggtgc
D V L P G T C V W S I A S E L I E K R C
cgtcggatggtggtggttgtctctgacgantacctgcaaagcaaggaatgtgacttccag
R R M V V V V S D X Y L Q S K E C D F Q
actaagtttgcgctcagcctctctccaggtgcccatcagaagcgactgatccccatcaag
T K F A L S L S P G A H Q K R L I P I K
```

Εικ.7: Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου MyD88 που περικλείεται από τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR, βάσει της αλληλουχίας NM_001166183.1 και η αντίστοιχη αμινοξική αλληλουχία. Με υπογράμμιση, σημειώνονται οι θέσεις υβριδοποίησης των εκκινητών: ο εκκινητής MyD88_F2 υβριδοποιείται με το τμήμα 470-488 bp της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και ο εκκινητής MyD88_R2 με το τμήμα 721-738 bp. Επίσης, με γκρι χρώμα σημειώνεται η περιοχή TIR.

Όμως, επειδή δεν είναι διαθέσιμη η γενωμική αλληλουχία για το γονίδιο *MyD88* στο *Ovis aries*, παρά μόνο η αλληλουχία του cDNA (NM_001166183.1), δεν ήταν δυνατόν να εξακριβωθεί εάν εντός του τμήματος που περικλείουν οι εκκινητές παρεμβάλλεται ιντρόνιο. Είναι γεγονός ότι η δομή του γονιδίου *MyD88* εμφανίζεται συντηρημένη στον άνθρωπο, στο ποντίκι και στον ταύρο (*Bos Taurus*), που είναι είδος συγγενικό του *Ovis aries*, και το γονίδιο *MyD88* στον ταύρο περιλαμβάνει 5 εξόνια που διακόπτονται από 4 ιντρόνια. Συνεπώς, συγκρίνοντας την γενωμική αλληλουχία του *Bos Taurus* (NC_007320.4) με την αλληλουχία του cDNA του *Ovis aries* (NM_001166183.1) είναι δυνατόν να καθοριστούν οι θέσεις των εξονίων και στο *Ovis aries*.

Στο τμήμα που ενισχύθηκε περιλαμβάνεται ολόκληρο το εξόνιο 3 (199 bp), το ιντρόνιο 3 (182 bp) και το εξόνιο 4 (96 bp) του γονιδίου *MyD88* (Εικ.8), όπως υπαγορεύεται από την αλληλουχία στο *Bos Taurus* (NC_007320.4) με την οποία υπάρχει μεγάλη ομολογία τουλάχιστον σε επίπεδο εξονίων. Το προϊόν της PCR σχεδιάστηκε έτσι ώστε να περιλαμβάνει και το ιντρόνιο, επειδή το μικρό μέγεθος των εξονίων δεν επέτρεπε την SSCP στα επιμέρους τμήματα (199 bp +96 bp αντίστοιχα, εξόνια 3 και 4). Να σημειωθεί εδώ ότι η ακριβής αλληλουχία του προϊόντος της PCR για το γονίδιο *MyD88* στο *Ovis aries* (με το αναμενόμενο ιντρόνιο), αποκαλύπτεται μετά την αλληλούχηση του τμήματος αυτού.



Εικ.8: Η δομή του γονιδίου *MyD88*. Με μπλε χρώμα σημειώνονται οι θέσεις υβριδοποίησης των εκκινητών *MyD88_F2* και *MyD88_R2*.

Ο λόγος που δεν ενισχύθηκε η αλληλουχία που αντιστοιχεί σε ολόκληρη την περιοχή TIR βασίζεται στην διακοπτόμενη δομή του γονιδίου, που περιγράφηκε παραπάνω. Για να συμπεριληφθεί όλο τμήμα της TIR

(αμινοξέα 160-296), θα έπρεπε η θέση υβριδοποίησης του εκκινητή να μετακινηθεί προς το 3' άκρο, στο τέλος του τελευταίου εξονίου (εξόνιο 5 ~1780bp). Συνεπώς, λόγω της δομής του γονιδίου, το προϊόν της PCR θα περιλάμβανε τα εξόνια 3, 4 και 5 και τα παρεμβαλλόμενα ιντρόνια 3 και 4 με αποτέλεσμα το μήκος του να ξεπεράσει τα 2,5 kb, γεγονός που θα καθιστούσε αδύνατη την πραγματοποίηση της PCR.

Βάσει των παραπάνω, αλλά και λόγω της επακόλουθης ανάλυσης SSCP, η οποία, για μεγαλύτερα τμήματα, έχει περιορισμένη διακριτική ικανότητα, το μήκος του προϊόντος της PCR περιορίστηκε στα 441 bp.

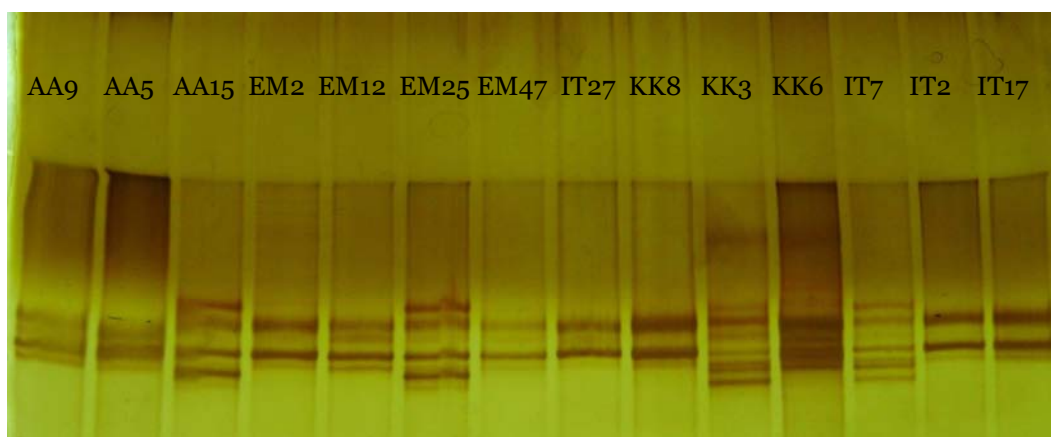
Το συγκεκριμένο κομμάτι επιλέχθηκε ως αντικείμενο μελέτης βάσει της λογικής ότι η ύπαρξη πολυμορφισμών σε αυτό πιθανότατα επηρεάζει τη δομή και ίσως την λειτουργικότητα της πρωτεϊνικής περιοχής TIR, που αποτελεί απαραίτητο συστατικό της δομής της MyD88 για την λειτουργία της ως πρωτεΐνη-προσαρμογέας. Κατ' επέκταση, όποια πιθανή επίπτωση έχουν οι πολυμορφισμοί στην πρωτεΐνη MyD88 ίσως να επιφέρει συνέπειες και στη σηματοδότηση μέσω TLR, άρα πιθανότατα και στην ανοσοαπόκριση κατά της *Brucella*.

2.Ανάλυση SSCP

Μετά την ενίσχυση των τμημάτων των *TLR9* και *MyD88* με PCR, εφαρμόστηκε ανάλυση SSCP σε όλα τα δείγματα και ακολούθησε συγκριτική μελέτη των προτύπων (Εικ.9 και Εικ.10).

TLR9

Η μελέτη του γονιδίου *TLR9* σε 116 άτομα αποκάλυψε την ύπαρξη 9 προτύπων (Εικ.9 και Πιν.3). Κάθε πρότυπο αντιστοιχεί σε ένα συγκεκριμένο αλληλόμορφο στα ομόζυγα άτομα ή σε συνδυασμό αλληλομόρφων στα ετερόζυγα άτομα.



Εικ.9 Ενδεικτική εικόνα των προτύπων που προέκυψαν από την ανάλυση του TLR9. Παρατηρούνται διαφορετικοί τύποι ζωνώσεων, καθένας από τους οποίους αντιστοιχεί σε διαφορετικό συνδυασμό αλληλομόρφων.

Οι κωδικοί που αναγράφονται στην Εικ.9 αντιστοιχούν στις διαφορετικές φυλές από τις οποίες προήλθαν τα δείγματα, ως εξής:

- κωδικός AA : Φριζάρτα (Αρτα).
- κωδικός KK: Μπούτσικα με κόκκινο κεφάλι και
κωδικός EM: Μπούτσικα με λευκό κεφάλι, (Τρίκαλα).
- κωδικός IT: Προγονικά άτομα της φυλής Μπούτσικα (Ιταλία)

Η Εικ.9 είναι ενδεικτική για την διάκριση μεταξύ προτύπων, αφού σε περιπτώσεις που υπήρχε αμφιβολία για το εάν δύο δείγματα ανήκαν όντως στο ίδιο πρότυπο, ακολουθούσε αποστολή και των δύο για αλληλούχηση με σκοπό την επαλήθευση της ομοιότητάς τους ή την αποκάλυψη όποιας διαφοράς δεν είχε εμφανιστεί στο πήκτωμα, λόγω τεχνικών λόγων (π.χ. ανομοιόμορφη χρώση).

Πιν.3:Ομαδοποίηση ατόμων βάσει προτύπων, όπως προέκυψε κατά την ανάλυση του TLR9.

<u>Πρότυπα TLR9</u>	<u>Άτομα</u>
Πρότυπο 1	AA2 AA3 AA4 AA7 AA8 AA9 AA10 AA11 AA13 AA17 AA20 AA23 AA24 AA27 AA31 EM1 EM4 EM17 EM37
Πρότυπο 2	AA5 AA12 AA18 AA19 AA22 AA29 AA30 EM8 EM10 EM11 EM14 EM16 EM22 EM23 EM26 EM29 EM30 EM33 EM35 EM42 EM44 EM45 EM46 EM48 EM27
Πρότυπο 3	AA1 AA14 AA15 AA16 AA33 EM3 EM32 EM36
Πρότυπο 4	EM2 EM5 EM6 EM7 EM12 EM13 EM18 EM20 EM24 EM28 EM31 EM34 EM38 EM40 EM41 EM43 EM47 KK1 KK4 KK8 KK9 IT2 IT3 IT4 IT5 IT6 IT10 IT12 IT14 IT15 IT16 IT17 IT18 IT20 IT21 IT22 IT23 IT26 IT27 IT28 IT29 IT30 IT32 IT34 IT37
Πρότυπο 5	KK3
Πρότυπο 6	KK6 IT1 IT8 IT19
Πρότυπο 7	KK7 KK10 IT7
Πρότυπο 8	EM25
Πρότυπο 9	IT11 IT13

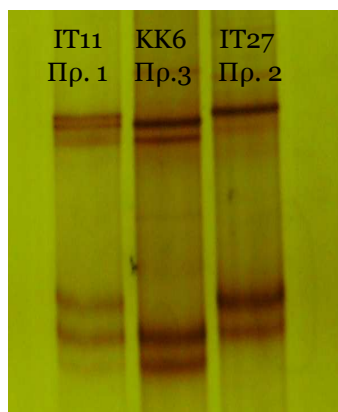
MyD88

Η εφαρμογή της μεθόδου PCR-SSCP για την ανάλυση του εξονίου 2 του γονιδίου MyD88 σε 102 άτομα αποκάλυψε την ύπαρξη 3 προτύπων όπως φαίνονται στην Εικ.10 και στον Πιν.4.

Το πρότυπο 1 περιέχει τα πρότυπα 2 και 3, πρόκειται δηλαδή για ετεροζυγωτία για τα 2 διαφορετικά αλληλόμορφα, αντίστοιχα.

Πιν.4: Ομαδοποίηση ατόμων βάσει προτύπων, όπως προέκυψε κατά την ανάλυση του MyD88.

<u>Πρότυπα MyD88</u>	<u>Άτομα</u>
Πρότυπο 1 <i>MyD88_1</i> <i>MyD88_2</i>	AA9 KK1 EM4 EM5 EM19 IT11
Πρότυπο 2 <i>MyD88_2</i>	AA1 AA2 AA5 AA10 AA11 AA12 AA14 AA15 AA16 AA17 AA19 AA20 KK2 KK3 KK5 KK8 KK10 EM7 EM9 EM10 EM11 EM12 EM13 EM14 EM15 EM16 EM17 EM18 EM20 EM23 EM25 EM26 EM27 EM28 EM29 EM30 EM31 EM32 EM33 EM34 EM37 EM38 EM39 EM40 EM41 EM42 EM45 EM46 EM47 IT1 IT3 IT4 IT6 IT7 IT9 IT28 IT30 IT33
Πρότυπο 3 <i>MyD88_1</i>	KK4 KK6 KK9 EM1 EM2 EM3 EM6 EM22 IT8 IT29



Εικ.10: Αντιπροσωπευτικά άτομα των 3 προτύπων που προέκυψαν από την ανάλυση του MyD88.

3. Αλληλούχηση

Μετά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης PCR-SSCP, επιλέχθηκαν προϊόντα PCR από αντιπροσωπευτικά άτομα για κάθε πρότυπο που προέκυψε, και για τα 2 γονίδια, όπως αναφέρονται στον Πίνακα 5. Τα προϊόντα PCR στη συνέχεια καθαρίστηκαν και στάλθηκαν στην εταιρεία MACROGEN για αλληλούχηση, ώστε να ταυτοποιηθούν οι πολυμορφισμοί στην νουκλεοτιδική αλληλουχία των υπό μελέτη τμημάτων.

Πιν.5: Τα προϊόντα PCR που στάλθηκαν για αλληλούχηση

TLR9	MyD88
Πρότυπο 1) AA10 2) AA22, AA29 3) EM3 4) EM12, EM18, KK8 5) KK3 6) KK6 7) IT7 8) EM25 9) IT11	Πρότυπο 1) KK1, IT11 2) IT8, IT17 3) KK6, IT27

TLR9

Από την αλληλούχιση των δειγμάτων για το *TLR9* ταυτοποιήθηκαν 7 διαφορετικά αλληλόμορφα, η νουκλεοτιδική αλληλουχία (414bp) των οποίων παρουσιάζεται στην Εικ.11.

TLR9_1	TTCGTGGACC	TGTCGGACAA	CCGCATCAGC	GGAGCTGCGA	GGCCGGTGGC	50
TLR9_2	TTCGTGGACC	TGTCGGACAA	CCGCATCAGC	GGAGCTGCGA	GGCCGGTGGC	
TLR9_3	TTCGTGGACC	TGTCGGACAA	CCGCATCAGC	GGAGCTGCGA	GGCCGGTGGC	
TLR9_4	TTCGTGGACC	TGTCGGACAA	CCGCATCAGC	GGAGCTGCGA	GGCCGGTGGC	
TLR9_5	TTCGTGGACC	TGTCGGACAA	CCGCATCAGC	GGAGCTGCGA	GGCCGGTGGC	
TLR9_6	TTCGTGGACC	TGTCGGACAA	CCGCATCAGC	GGAGCTGCGA	GGCCGGTGGC	
TLR9_7	TTCGTGGACC	TGTCGGACAA	CCGCATCAGC	GGAGCTGCGA	GGCCGGTGGC	
TLR9_1	CGCCCTCGGG	GAGGTGGACA	GCGGGGTGGA	AGTCTGGCGG	TGGCCCAGGG	100
TLR9_2	CGCCCTCGGG	GAGGTGGACA	GTGGGGTGGA	AGTCTGGCGG	TGGCCCAGGG	
TLR9_3	CGCCCTCGGG	GAGGTGGACA	GCGGGGTGGA	AGTCTGGCAG	TGGCCCAGGG	
TLR9_4	CGCCCTCGGG	GAGGTGGACA	GTGGGGTGGA	AGTCTGGCGG	TGGCCCAGGG	
TLR9_5	CGCCCTCGGG	GAGGTGGACA	GCGGGGTGGA	AGTCTGGCGG	TGGCCCAGGG	
TLR9_6	CGCCCTCGGG	GAGGTGGACA	GCGGGGTGGA	AGTCTGGCAG	TGGCCCAGGG	
TLR9_7	CGCCCTCGGG	GAGGTGGACA	GCGGGGTGGA	AGTCTGGCGG	TGGCCCAGGG	
TLR9_1	GCCTCGCTCC	AGGCCCGCTG	GCCGCCGTCA	GCGCAAAGGA	CTTCATGCCA	150
TLR9_2	GCCTCGCTCC	AGGCCCGCTG	GCCGCCGTCA	GCGCAAAGGA	CTTCATGCCA	
TLR9_3	GCCTCGCTCC	AGGCCCGCTG	GCCGCCGTCA	GCTCAAAGGA	CTTCATGCCA	
TLR9_4	GCCTCGCTCC	AGGCCCGCTG	GCCGCCGTCA	GCGCAAAGGA	CTTCATGCCA	
TLR9_5	GCCTCGCTCC	AGGCCCGCTG	GCCGCCGTCA	GCGCAAAGGA	CTTCATGCCA	
TLR9_6	GCCTCGCTCC	AGGCCCGCTG	GCCGCCGTCA	GCTCAAAGGA	CTTCATGCCA	
TLR9_7	GCCTCGCTCC	AGGCCCGCTG	GCCGCCGTCA	GCTCAAAGGA	CTTCATGCCA	
TLR9_1	AGCTGCAACC	TCAACTTCAC	CTTGGACCTG	TCACGGAACA	ACCTGGTGAC	200
TLR9_2	AGCTGCAACC	TCAACTTCAC	CTTGGACCTG	TCACGGAACA	ACCTGGTGAC	
TLR9_3	AGCTGCAACC	TCAACTTCAC	CTTGGACCTG	TCACGGAACA	ACCTGGTGAC	
TLR9_4	AGCTGCAACC	TCAACTTCAC	CTTGGACCTG	TCACGGAACA	ACCTGGTGAC	
TLR9_5	AGCTGCAACC	TCAACTTCAC	CTTGGACCTG	TCACGGAACA	ACCTGGTGAC	
TLR9_6	AGCTGCAACC	TCAACTTCAC	CTTGGACCTG	TCACGGAACA	ACCTGGTGAC	
TLR9_7	AGCTGCAACC	TCAACTTCAC	CTTGGACCTG	TCACGGAACA	ACCTGGTGAC	
TLR9_1	GATCCAGCAG	GAGATGTTTA	CCCGCCTCTC	CCGCCTCCAG	TGCCTGCGCC	250
TLR9_2	GATCCAGCAG	GAGATGTTTA	CCCGCCTCTC	CCGCCTCCAG	TGCCTGCGCC	
TLR9_3	GATCCAGCAG	GAGATGTTTA	CCCGCCTCTC	CCGCCTCCAG	TGCCTGCGCC	
TLR9_4	GATCCAGCAG	GAGATGTTTA	CCCGCCTCTC	CCGCCTCCAG	TGCCTGCGCC	
TLR9_5	GATCCAGCAG	GAGATGTTTA	CCCGCCTCTC	CCGCCTCCAG	TGCCTGCGCC	
TLR9_6	GATCCAGCAG	GAGATGTTTA	CCCGCCTCTC	CCGCCTCCAG	TGCCTGCGCC	
TLR9_7	GATCCAGCAG	GAGATGTTTA	CCCGCCTCTC	CCGCCTCCAG	TGCCTGCGCC	
TLR9_1	TGAGCCACAA	CAGCATCTCG	CAGGCGGTTA	ATGGCTCGCA	GTTCGTGCCG	300
TLR9_2	TGAGCCACAA	CAGCATCTCG	CAGGCGGTTA	ATGGCTCGCA	GTTCGTGCCG	
TLR9_3	TGAGCCACAA	CAGCATCTCG	CAGGCGGTTA	ATGGCTCGCA	GTTCGTGCCG	
TLR9_4	TGAGCCACAA	CAGCATCTCG	CAGGCGGTTA	ATGGCTCGCA	GTTCGTGCCG	
TLR9_5	TGAGCCACAA	CAGCATCTCG	CAGGCGGTTA	ATGGCTCGCA	GTTCGTGCCG	
TLR9_6	TGAGCCACAA	CAGCATCTCG	CAGGCGGTTA	ATGGCTCGCA	GTTCGTGCCG	
TLR9_7	TGAGCCACAA	CAGCATCTCG	CAGGCGGTTA	ATGGCTCGCA	GTTCGTGCCG	

TLR9_1	CTGACCCGCC	TGCGAGTGCT	CGACCTGTCC	TACAACAAGC	TGGACCTGTA	350
TLR9_2	CTGACCCGCC	TGCGAGTGCT	CGACCTGTCC	TACAACAAGC	TGGACCTGTA	
TLR9_3	CTGACCCGCC	TGCGAGTGCT	TGACCTGTCC	TACAACAAGC	TGGACCTGTA	
TLR9_4	CTGACCCGCC	TGCGAGTGCT	CGACCTGTCC	TACAACAAGC	TGGACCTGTA	
TLR9_5	CTGACCCGCC	TGCGAGTGCT	TGACCTGTCC	TACAACAAGC	TGGACCTGTA	
TLR9_6	CTGACCCGCC	TGCGAGTGCT	CGACCTGTCC	TACAACAAGC	TGGACCTGTA	
TLR9_7	CTGACCCGCC	TGCGAGTGCT	TGACCTGTCC	TACAACAAGC	TGGACCTGTA	

TLR9_1	CCATGGGCGC	TCGTTACGG	AGCTGCCGCA	GCTGGAGGCA	CTGGACCTCA	400
TLR9_2	CCATGGGCGC	TCGTTACGG	AGCTGCCGCA	GCTGGAGGCA	CTGGACCTCA	
TLR9_3	CCATGGGCGC	TCGTTACGG	AGCTGCCGCA	GCTGGAGGCA	CTGGACCTCA	
TLR9_4	CCATGGGCGC	TCGTTACGG	AGCTGCCGCA	GCTGGAGGCA	CTGGACCTCA	
TLR9_5	CCATGGGCGC	TCGTTACGG	AGCTGCCGCA	GCTGGAGGCA	CTGGACCTCA	
TLR9_6	CCATGGGCGC	TCGTTACGG	AGCTGCCGCA	GCTGGAGGCA	CTGGACCTCA	
TLR9_7	CCATGGGCGC	TCGTTACGG	AGCTGCCGCA	GCTGGAGGCA	CTGGACCTCA	

TLR9_1	GCTACAACAG	CCAG	414
TLR9_2	GCTACAACAG	CCAG	
TLR9_3	GCTACAACAG	CCAG	
TLR9_4	GCTACAACAG	CCAG	
TLR9_5	GCTACAACAG	CCAG	
TLR9_6	GCTACAACAG	CCAG	
TLR9_7	GCTACAACAG	CCAG	

Εικ.11: Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των αλληλομόρφων του TLR9. Με γκρι επισημαίνονται οι αλλαγές νουκλεοτιδίου.

Οι πολυμορφισμοί αφορούν αποκλειστικά νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις (SNPs) σε 5 σημεία της αλληλουχίας: στα νουκλεοτίδια 72, 89, 133, 307, και 321 (σύμφωνα με την αρίθμηση της παρούσας εργασίας, Εικ.11).

Τρεις από αυτές τις νουκλεοτιδικές αλλαγές έχουν ως αποτέλεσμα αλλαγή στην αμινοξική ακολουθία της πολυπεπτιδικής αλυσίδας που προκύπτει από τη μετάφραση του γονιδίου, όπως αυτή παρουσιάζεται στην Εικ.12.

TLR9_1	FVDLSNDRISGAARPVAALGEVDSGVEVW	RWPRGLAPGPLAAVS	AKDFMPSCNLN	55
TLR9_2	FVDLSNDRISGAARPVAALGEVDSGVEVW	RWPRGLAPGPLAAVS	AKDFMPSCNLN	
TLR9_3	FVDLSNDRISGAARPVAALGEVDSGVEVW	QWPRGLAPGPLAAVS	SKDFMPSCNLN	
TLR9_4	FVDLSNDRISGAARPVAALGEVDSGVEVW	RWPRGLAPGPLAAVS	AKDFMPSCNLN	
TLR9_5	FVDLSNDRISGAARPVAALGEVDSGVEVW	RWPRGLAPGPLAAVS	AKDFMPSCNLN	
TLR9_6	FVDLSNDRISGAARPVAALGEVDSGVEVW	QWPRGLAPGPLAAVS	SKDFMPSCNLN	
TLR9_7	FVDLSNDRISGAARPVAALGEVDSGVEVW	RWPRGLAPGPLAAVS	SKDFMPSCNLN	

TLR9_1 FTLDLSRNNLVVTIQQEMFTRLSRLQCLRLSHNSISQAVNGSQFVPLT**RL**RVLDLS 110
 TLR9_2 FTLDLSRNNLVVTIQQEMFTRLSRLQCLRLSHNSISQAVNGSQFVPLT**RL**RVLDLS
 TLR9_3 FTLDLSRNNLVVTIQQEMFTRLSRLQCLRLSHNSISQAVNGSQFVPLT**GL**RVLDLS
 TLR9_4 FTLDLSRNNLVVTIQQEMFTRLSRLQCLRLSHNSISQAVNGSQFVPLT**GL**RVLDLS
 TLR9_5 FTLDLSRNNLVVTIQQEMFTRLSRLQCLRLSHNSISQAVNGSQFVPLT**GL**RVLDLS
 TLR9_6 FTLDLSRNNLVVTIQQEMFTRLSRLQCLRLSHNSISQAVNGSQFVPLT**RL**RVLDLS
 TLR9_7 FTLDLSRNNLVVTIQQEMFTRLSRLQCLRLSHNSISQAVNGSQFVPLT**GL**RVLDLS

TLR9_1 YNKLDLYHGRSFTELPQLEALDLSYNSQ 138
 TLR9_2 YNKLDLYHGRSFTELPQLEALDLSYNSQ
 TLR9_3 YNKLDLYHGRSFTELPQLEALDLSYNSQ
 TLR9_4 YNKLDLYHGRSFTELPQLEALDLSYNSQ
 TLR9_5 YNKLDLYHGRSFTELPQLEALDLSYNSQ
 TLR9_6 YNKLDLYHGRSFTELPQLEALDLSYNSQ
 TLR9_7 YNKLDLYHGRSFTELPQLEALDLSYNSQ

Εικ.12: Η αμινοξική αλληλουχία των διαφορετικών αλληλομόρφων του TLR9. Με κόκκινο επισημαίνονται οι αλλαγές αμινοξέων.

Πιο συγκεκριμένα, στη θέση 89 στα αλληλόμορφα *TLR9_3* και 6 υπάρχει μια αδενίνη (A) ενώ στα υπόλοιπα πέντε μια γουανίνη (G), οπότε και η γλουταμίνη, Q, (CAG) που υπάρχει στη θέση 30 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας αντικαθίσταται από αργινίνη, R, (CGG).

Στη θέση 133 στα *TLR9_3*, 6 και 7 υπάρχει μια θυμίνη (T) ενώ στα υπόλοιπα τέσσερα αλληλόμορφα μια γουανίνη (G), που έχει ως αποτέλεσμα στο προϊόν της μετάφρασης των *TLR9_3*, 6 και 7 να υπάρχει το αμινοξύ σερίνη στη θέση 45, S (TCA), αντί της αλανίνης, A (GCA).

Στα αλληλόμορφα *TLR9_2*, 1 και 6 η θέση 307 της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας καταλαμβάνεται από κυτοσίνη (C) ενώ στα *TLR9_5*, 3, 4 και 7 υπάρχει μια γουανίνη (G). Συνεπώς, στην αμινοξική αλληλουχία των *TLR9_2*, 1 και 6 στην θέση 104 βρίσκεται το αμινοξύ αργινίνη, R (CGC) ενώ στα υπόλοιπα τέσσερα αλληλόμορφα υπάρχει γλυκίνη, G (GGC).

Οι πολυμορφισμοί που βρίσκονται στις θέσεις 72 και 321 της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία συνώνυμων κωδικονίων στο mRNA και για αυτόν το λόγο δεν οδηγούν σε αλλαγές στην αμινοξική ακολουθία στα προϊόντα των διαφορετικών

αλληλομόρφων. Ομοίως, στα αλληλόμορφα *TLR9_2* και *4* στη θέση 72 υπάρχει μια θυμίνη (T) ενώ στα υπόλοιπα αλληλόμορφα υπάρχει μια κυτοσίνη (C). Και οι δύο τριπλέτες που προκύπτουν δίνουν το αμινοξύ σερίνη, S (AGT, AGC) στη θέση 108 της αμινοξικής αλληλουχίας. Παρομοίως, στη θέση 321 της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στα *TLR9_5* και *TLR9_3* συναντάται θυμίνη (T) και κυτοσίνη (C) στα *TLR9_2, 1* και *4*. Και στις δύο περιπτώσεις (CTT, CTC) το αμινοξύ που προκύπτει είναι η λευκίνη, L στη θέση 24 στην αντίστοιχη αμινοξική ακολουθία.

Τα επτά (7) αλληλόμορφα που προέκυψαν για το *TLR9* αντιστοιχούν στα εννέα (9) διαφορετικά πρότυπα που παρατηρήθηκαν κατά την ανάλυση SSCP (Πιν.3), όπως παρουσιάζεται στον Πιν.6.

Το τμήμα της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας που μελετήθηκε περιλαμβάνει τις βάσεις 1344 - 1757 bp (AY859727, NCBI GenBank) που σε παλαιότερη μελέτη είχαν συμπεριληφθεί σε τμήμα που διερευνήθηκε για την παρουσία πολυμορφισμών (Zhou, 2008). Εντός του τμήματος αυτού έχουν βρεθεί SNPs στα νουκλεοτίδια 1384 και 1452 και τα 3 διαφορετικά αλληλόμορφα που βρέθηκαν έχουν κατατεθεί στην GenBank με κωδικούς EF656458, EF656459 και EF656460. Η μία από αυτές τις αλληλουχίες, με κωδικό EF656458.1, αντιστοιχεί στο αλληλόμορφο *TLR9_2* που προέκυψε από την ανάλυσή μας.

Το αλληλόμορφο *TLR9_1* που προέκυψε από την ανάλυσή μας είναι όμοιο με αλληλουχία που είναι ήδη κατατεθειμένη στην GenBank, με κωδικό GU451250.1 (Mikula *et al*, αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Τα αλληλόμορφα *TLR9_3*, *TLR9_4*, *TLR9_5*, *TLR9_6*, και *TLR9_7* αποτελούν νέες αλληλουχίες που δεν έχουν καταχωρηθεί σε κάποια βάση δεδομένων και εμφανίζουν SNPs στις θέσεις 72, 89, 133, 307, και 321 της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (σύμφωνα με την αρίθμηση της παρούσας εργασίας), όπως και τα *TLR9_1* και *TLR9_2*.

Βάσει των στοιχείων που παρουσιάστηκαν στους Πιν.3 και Πιν.6, σχετικά με την κατανομή των ατόμων στα πρότυπα που παρατηρήθηκαν, και την αντιστοιχία των προτύπων με τα αλληλόμορφα που προέκυψαν από την αλληλούχηση, υπολογίστηκαν οι συχνότητες των επτά (7) αλληλομόρφων του *TLR9* (Πιν.7)

Πιν.6:Αντιστοιχία προτύπων και αλληλομόρφων για το TLR9

<u>Πρότυπα</u> <u>TLR9</u>	<u>Αλληλόμορφα</u>
Πρότυπο 1	TLR9_1 (GU451250.1)
Πρότυπο 2	TLR9_1 (GU451250.1) TLR9_2 (EF656458.1) ετεροζυγωτία
Πρότυπο 3	TLR9_3
Πρότυπο 4	TLR9_1 (GU451250.1) TLR9_5 Ετεροζυγωτία
Πρότυπο 5	TLR9_1 (GU451250.1) TLR9_3 Ετεροζυγωτία
Πρότυπο 6	TLR9_4
Πρότυπο 7	TLR9_1(GU451250.1) TLR9_6 Ετεροζυγωτία
Πρότυπο 8	TLR9_3 TLR9_5 Ετεροζυγωτία
Πρότυπο 9	TLR9_1 (GU451250.1) TLR9_7 Ετεροζυγωτία

Πιν.7: Συχνότητες αλληλομόρφων για το *TLR9*.

Συχνότητες αλληλομόρφων <i>TLR9</i>									
Φυλή	Κωδικός	Αριθμός ατόμων	Συχν. <i>TLR9_1</i>	Συχν. <i>TLR9_2</i>	Συχν. <i>TLR9_3</i>	Συχν. <i>TLR9_4</i>	Συχν. <i>TLR9_5</i>	Συχν. <i>TLR9_6</i>	Συχν. <i>TLR9_7</i>
Φριζάρτα	AA	27	68,5%	13%	18,5%	—	—	—	—
Μπούτσικα Κόκκινο & λευκό κεφάλι	KK	8	49%	17,7%	7,8%	2%	21,5%	2%	—
	EM	43							
Προγονικά Μπούτσικα (Ιταλία)	IT	30	45%	—	—	10%	40%	1,7%	3,3%
Σύνολο		108	52,8%	11,6%	8,3%	5,1%	21,26%	1,4%	0,9%

Η συχνότητα των αλληλομόρφων *TLR9_1* και *TLR9_5* είναι η υψηλότερη, ενώ γενικά η κατανομή των διάφορων αλληλομόρφων διαφέρει σημαντικά ανάλογα με τη φυλή.

- Στα άτομα της φυλής **Φριζάρτα** η συχνότητα του *TLR9_1* είναι η υψηλότερη, και ακολουθούν τα *TLR9_2* και *TLR9_3*, ενώ τα υπόλοιπα τεσσера αλληλόμορφα απουσιάζουν εντελώς.
- Στην φυλή των **Μπούτσικα** οι συχνότητες των αλληλομόρφων προσεγγίζουν σε μεγάλο βαθμό εκείνες τους συνόλου, με τη διαφορά ότι απουσιάζει το *TLR9_7* από τα άτομα της φυλής αυτής.
- Στα άτομα που είναι **προγονικά των Μπούτσικα** η συχνότητα των αλληλομόρφων *TLR9_1* και *TLR9_5* είναι η υψηλότερη, ακολουθούν τα *TLR9_4*, *TLR9_6* και *TLR9_7* και παρατηρείται απουσία των αλληλομόρφων *TLR9_2* και *TLR9_3*.

Είναι πιθανόν η παρουσία συγκεκριμένων αλληλομόρφων να εξαρτάται από την φυλή, γεγονός το οποίο θα πρέπει να ελεγχθεί με την ανάλυση μεγαλύτερου αριθμού ατόμων από κάθε φυλή.

MyD88

Η αλληλούχηση των προϊόντων της PCR για το *MyD88* αποκάλυψε και την ακριβή αλληλουχία του, που συμπεριλαμβάνει και το ιντρόνιο 3, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Στην Εικ.14 φαίνεται η νουκλεοτιδική αλληλουχία του ιντρονίου η οποία ξεκινάει με GT και καταλήγει σε AG, ακολουθώντας τον κανόνα GT-AG που βρίσκει εφαρμογή στα περισσότερα ιντρόνια στα θηλαστικά (95% των ιντρονίων του ανθρώπου) και βοηθά στον εντοπισμό τους.

Από την αλληλούχηση των δειγμάτων για το *MyD88* ταυτοποιήθηκαν 2 διαφορετικά αλληλόμορφα, η νουκλεοτιδική αλληλουχία των οποίων παρουσιάζεται στην Εικ.13.

Συγκεκριμένα, παρατηρείται πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου στην θέση 102 της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, με το αλληλόμορφο *MYD88_1* να έχει αδερίνη (A) ενώ το *MYD88_2* γουανίνη (G). Όμως το νουκλεοτίδιο αυτό αποτελεί μέρος της τριπλέτας AAA και AAG αντίστοιχα, η οποία κωδικοποιεί το αμινοξύ λυσίνη, K. Η αλλαγή λοιπόν σε αυτό το νουκλεοτίδιο έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία συνώνυμων κωδικονίων στο mRNA και για αυτόν το λόγο δεν οδηγεί σε αλλαγές στην αμινοξική αλληλουχία στα προϊόντα των διαφορετικών αλληλομόρφων του *MyD88*.

Το γεγονός αυτό ίσως είναι ενδεικτικό της σημασίας της συγκεκριμένης περιοχής για την δημιουργία λειτουργικής πρωτεΐνης *MyD88*, καθώς ακόμα και σε άτομα με διαφορετικά αλληλόμορφα η δομή του πολυπεπτιδίου στο σημείο αυτό παραμένει ακριβώς ίδια.

Όπως αναλύθηκε και παραπάνω, το τμήμα αυτό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας αντιστοιχεί στην περιοχή TIR της πρωτεΐνης η οποία θεωρείται απαραίτητη για τη λειτουργία της ίδιας αλλά και του σηματοδοτικού μονοπατιού TLR9- *MyD88*- μεταγραφικοί παράγοντες ανοσοαπόκρισης.

MYD88_1 TAGCCTGAGT ATTTTGATGC CTTTCATCTGC TACTGCCCCA GCGATATTGA **50**
MYD88_2 TAGCCTGAGT ATTTTGATGC CTTTCATCTGC TACTGCCCCA GCGATATTGA

MYD88_1 GTTTGTCCAT GAGATGATCC GGCAGCTGGA ACAGACAAAC TATCGGCTGA **100**
MYD88_2 GTTTGTCCAC GAGATGATCC GGCAGCTGGA ACAGACAAAC TATCGGCTGA

MYD88_1 AATTGTGCGT GTCTGACCGT GACGTCCTGC CTGGCACCTG TGTCTGGTCC **150**
MYD88_2 AGTTGTGCGT GTCTGACCGT GACGTCCTGC CTGGCACCTG TGTCTGGTCC

MYD88_1 ATCGCCAGTG AACTCATTGA GAAGAGGTTG GCTATGTGGC CACAGGGCAA **200**
MYD88_2 ATCGCCAGTG AACTCATTGA GAAGAGGTTG GCTATGTGGC CACAGGGCAA

MYD88_1 GTGGGTGGGT GTGCAAAGCC CTGCCAGGGA TCCCCATGCT GGGGCCCTCC **250**
MYD88_2 GTGGGTGGGT GTGCAAAGCC CTGCCAGGGA TCCCCATGCT GGGGCCCTCC

MYD88_1 CAGTCAGCCC CTGTCTAGCC TGGCATACTG GGATCCTCCC AAGGCTGTCC **300**
MYD88_2 CAGTCAGCCC CTGTCTAGCC TGGCATACTG GGATCCTCCC AAGGCTGTCC

MYD88_1 CCTGGTGAGT CACCACAGTG CCTGTAGCCT GCCCACTCTC CCCTAGGTGC **350**
MYD88_2 CCTGGTGAGT CACCACAGTG CCTGTAGCCT GCCCACTCTC CCCTAGGTGC

MYD88_1 CGTCGGATGG TGGTGGTTGT CTCTGACGAA TACCTGCAAA GCAAGGAATG **400**
MYD88_2 CGTCGGATGG TGGTGGTTGT CTCTGACGAA TACCTGCAAA GCAAGGAATG

MYD88_1 TGAATTCCAG ACTAAGTTTG CGCTCAGCCT CTCTCCAGGT A **441**
MYD88_2 TGAATTCCAG ACTAAGTTTG CGCTCAGCCT CTCTCCAGGT A

Εικ.13: Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των αλληλομόρφων του MyD88. Με γκρι χρώμα σημειώνεται η θέση της αλλαγής νουκλεοτιδίου.

TAGCCTGAGT ATTTTGATGC CTTTCATCTGC TACTGCCCCA GCGATATTGA **50**
 GTTTGTCCAT GAGATGATCC GGCAGCTGGA ACAGACAAAC TATCGGCTGA **100**
AATTGTGCGT GTCTGACCGT GACGTCCTGC CTGGCACCTG TGTCTGGTCC **150**
 ATCGCCAGTG AACTCATTGA GAAGAG**G**TTG GCTATGTGGC CACAGGGCAA **200**
 GTGGGTGGGT GTGCAAAGCC CTGCCAGGGA TCCCCATGCT GGGGCCCTCC **250**
 CAGTCAGCCC CTGTCTAGCC TGGCATACTG GGATCCTCCC AAGGCTGTCC **300**
 CCTGGTGAGT CACCACAGTG CCTGTAGCCT GCCCACTCTC CCCTA**GG**GTGC **350**
 CGTCGGATGG TGGTGGTTGT CTCTGACGAA TACCTGCAAA GCAAGGAATG **400**
 TGAATTCCAG ACTAAGTTTG CG**CTC**AGCCT CTCTCCAGGT **A** **441**

Εικ.14: Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του προϊόντος PCR του γονιδίου MyD88 βάσει των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης. Με υπογράμμιση, σημειώνονται οι θέσεις υβριδοποίησης των εκκινήτων, με γκρι επισημαίνονται τα εξόνια, με έντονα γραμμάτια τα άκρα του ιντρονίου (GT-AG) και η αλλαγή νουκλεοτιδίου (A).

Συχνότητες αλληλομόρφων

Τα αλληλόμορφο *MyD88_1* αντιστοιχεί στο Πρότυπο 3 και το αλληλόμορφο *MyD88_2* στο Πρότυπο 2, ενώ στο Πρότυπο 1 εμφανίζεται ετεροζυγωτία που περιλαμβάνει και τα δυο αυτά αλληλόμορφα. Βάσει των στοιχείων του Πίνακα 2 σχετικά με την κατανομή των ατόμων στα 3 πρότυπα, υπολογίστηκαν οι συχνότητες των δύο αλληλομόρφων για κάθε πληθυσμό (Πιν.8)

Πιν.8: Συχνότητες αλληλομόρφων για το *MyD88*

Συχνότητες αλληλομόρφων <i>MyD88</i>				
Φυλή	Κωδικός	Αριθμός ατόμων	Συχνότητα <i>MyD88_1</i>	Συχνότητα <i>MyD88_2</i>
Φριζάρτα	AA	13	3,8%	96,2%
Μπούτσικα Κόκκινο & λευκ κεφάλι	KK	9	20,4%	79,6%
	EM	40		
Προγονικά Μπούτσικα (Ιταλία)	IT	12	20,8%	79,2%
Σύνολο		74	17,5%	82,5%

Σε όλους τους πληθυσμούς παρατηρείται πολύ υψηλότερη συχνότητα του αλληλομόρφου *MyD88_2* σε σχέση με το αλληλόμορφο *MyD88_1*. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής αφορούν μικρό σχετικά αριθμό ατόμων και αποτελούν προκαταρκτικό στάδιο της μελέτης του γονιδίου *MyD88*. Το ίδιο ισχύει και για το γονίδιο του *TLR9*, καθώς και εκεί απαιτείται εξέταση μεγαλύτερου πληθυσμού.

Σκοπός είναι να χρησιμοποιηθούν τα δεδομένα από τέτοιου τύπου αναλύσεις σε περαιτέρω μελέτες με τελικό στόχο τον καθορισμό των γενοτύπων που είναι επιρρεπείς και εκείνων που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στην βρουκέλλωση από *Brucella abortus*.

Η ανάλυση που πραγματοποιήθηκε αποτελεί το πρώτο βήμα για περαιτέρω μελέτες, που θα περιλαμβάνουν την ανίχνευση SNPs σε όλο το μήκος της αλληλουχίας του γονιδίου και κατόπιν επιλογή συγκεκριμένου SNP για να γίνει εξεταστεί η σχέση του με την εκδήλωση ανθεκτικότητας στην βρουκέλλωση. Πρωτίστως θα πρέπει να εξεταστούν οι μη συνώνυμοι πολυμορφισμοί, που επιφέρουν αλλαγές στη αμινοξική ακολουθία και να διαπιστωθεί εάν οι αλλαγές αυτές επηρεάζουν τελικά την δομή της πρωτεΐνης, και αν σε ποιο σημείο ακριβώς.

Με μελέτη της κρυσταλλικής δομής της πρωτεΐνης, και εφόσον είναι γνωστά τα μοτίβα που εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις, μπορούν ακολούθως να εντοπιστούν με ακρίβεια οι θέσεις αλλαγής των αμινοξέων, και η σχέση τους με τα συγκεκριμένα μοτίβα. Αυτό ισχύει και για τα δύο γονίδια που μελετήθηκαν καθώς είναι γνωστή, έως ένα βαθμό, τόσο η σημασία των LRRs και των συνδετικών περιοχών τους για τον υποδοχέα TLR9, όσο και η σημασία της περιοχής TIR για την πρωτεΐνη MyD88.

Για την ολοκλήρωση της μελέτης, εκτός από ανάλυση σε μοριακό επίπεδο, απαιτείται και η συλλογή επιδημιολογικών στοιχείων για τους υπό εξέταση πληθυσμούς. Για το σκοπό αυτό, θα πρέπει να ξεκινήσει μια συνεργασία με κτηνιάτρους, έτσι ώστε να γίνεται γνωστό πόσα και ποια άτομα μιας φυλής ή ενός κοπαδιού νοσούν, αλλά και να εντοπίζονται τα άτομα εκείνα που δεν μολύνονται. Έτσι, θα καθοριστούν αλληλομορφικές και γονοτυπικές συχνότητες σε μεγαλύτερο πληθυσμό ατόμων, ενώ επειδή θα είναι γνωστό εάν τα άτομα ασθενούν θα είναι εφικτή και η συσχέτιση της παρουσίας συγκεκριμένων αλληλομόρφων και της απόκρισης στην *B. abortus*.

Τα αποτελέσματα που θα προκύψουν μπορούν να βρουν εφαρμογή στον έλεγχο των συνεπειών της βρουκέλλωσης. Ο σκοπός είναι οι παραπάνω διαδικασίες να καταλήξουν σε ταυτοποίηση γονότυπων ανθεκτικών στην *B. abortus*, με απώτερο στόχο να βρει πρακτική εφαρμογή η πληροφορία αυτή στην γενετική βελτίωση των φυλών του είδους *Ovis aries*, μέσω επιλογής των ζώων προς εκτροφή από πληθυσμούς που εμφανίζουν ανθεκτικότητα ή αυξημένη αντίσταση κατά της ασθένειας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Βασική Ανοσολογία, Α. Κ. Abbas, Α. Η. Lichtman, ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ Π. Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ, 2004.
- Η βρουκέλλωση των βοοειδών και το Εθνικό Πρόγραμμα Εκρίζωσης, Τμήμα Υγείας των Ζώων, Δ/νση Κτηνιατρικής, Νομαρχιακή Αυτοδιοίκηση Θεσσαλονίκης.
- Brucellosis in Sheep and Goats (*Brucella melitensis*),(12/7/2001) Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare , European Commission.
- Bell, J.K, Mullen, G.E.D., Leifer, C.A., Mazzoni, A., Ravies, D.R., Segal, D.M., *Trends Immunol.*, vol. 24 (2003), 528-533.
- Boldin, M.P., Self association of the DDs of p55 TNF receptor Fas/APO 1 prompts signaling for TNF and Fas/APO effects, *J.Biol.Chem* 270 (1995) 387-91.
- Boschioroli, M.L., Foulogne, V., O'Callaghan, D., Brucellosis: a world-wide zoonosis, *Curr. Opin. Microbiol.* 4 (2001) 58-64.
- Celli, J., Gorvel, J.P., Organelle robbery: *Brucella* interactions with the endoplasmic reticulum, *Curr. Opin. Microbiol.* 7 (2004) 93-97.
- Copin, R., De Baetselier, P., Carlier, Y., Letesson, J.J., Muraille, E., MyD88 dependent activation of B220⁺CD11⁺LY-6C⁺ dendritic cells during *Brucella melitensis* infection, *J.Immunol.* 178 (2007) 5182-5191.
- Corbel, M.J., Brinley-Morgan, W.J., Genus *Brucella* Meyer and Shaw 1920, 173AL, In Krieg, N.R., Holt, J.G.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol.1 (1984), Williams & Wilkins, Baltimore –London, 377-388.
- Corbel, M.J., Brucellosis:an overview, *Emerg. Infect. Dis.*, 3 (1997) 213-221.
- Franco, M.P., Mulder, M., Gilman, R.H., Smits, H.L., Human brucellosis, *Lancet Infect. Dis.* 7 (2007) 775-786.
- Garin-Bastuji, B., Gerbier, G., Douzal, Y., Vaucel, D., Hummel, N., Thiebaud, M., Grayon, M., Verger, J.M., La brucellose animale en France 1993, *Epidemiol.Sante.Anim.* 26 (1994) 103-130.

- Gay ,N.J., Keith, F.J., *Drosophila* Toll and IL-1 receptor, *Nature* 351 (1991) 355-356.
- Golding, B., Scott, D.E., Scharf, O., L-Huang, Y., Zaitseva, M., Lapham, C, Eller, N., Golding, H., Immunity and protection against *Brucella abortus*, *Microbes Infect.* 3 (2001) 43-38.
- Huang, L.Y., Aliberti, J., Leifer, C.A., Segal, D.M., Sher, A., Golenbock, D.T., Golding, B., Heat-killed *Brucella abortus* induces TNF and IL-12p40 by distinct MyD88-dependent pathways: TNF, unlike IL-12p40 secretion, is Toll-like Receptor 2 dependent, *J.Immunol.*171 (2003) 1441-1446.
- Huang, L.Y., Ishii, K..J., Akira, S., Aliberti, J., Golding,B., Th1-like cytokine induction by heat-killed *Brucella abortus* is dependent on triggering of TLR9, *J.Immunol.*175 (2005) 3964-3970.
- Hultmark, D., Macrophage differentiation marker MyD88 is a member of the Toll/ IL-1 R family, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199 (1994)144-6.
- Kawai,T., Sato, S., Ishii, K..J., Coban, C., Hemmi, H., Yamamoto, M., Terai, K., Matsuda, M., Inoue, J., Uematsu, S., Takeuchi, O., Akira, S., Interferon alfa induction through Toll like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6, *Nat.Immunol.*5 (2004) 1061-1068.
- Kawai, T., Akira, S., TLR Signaling, *Semin. Immunol.* 19 (2007)24-32.
- Kawai, T., Akira, S., Signaling to Nf-kappaB by Toll-like receptors, *Trends Mol. Med.* 13(2007) 460-469.
- Li, S., Strelow, A., Fontana, E.J., Wesche, H., IRAK-4 a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK kinase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99 (2002)5567-72.
- Lopez-Merino, A., Brucellosis in Latin America. In “Brucellosis: Clinical and laboratory aspects of human infection”, (Young, E.J., and Corbel, J.M., eds).*CRC Press, Boca Raton.*(1989) 151-161.
- Macedo, G.C., Magnani, D.M., Carvalho, N.B., Bruna-Romero, O., Gazzinelli, R.T., Oliveira, S.C., Central role of MyD88-dependant dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control *Brucella abortus* infection, *J.Immunol.*180 (2008)108-1087.

- Medzhitov, R., Recognition of microorganisms and activation of the immune response, *Nature* 449 (2007) 819-826.
- Oliveira, S.C., de Oliveira, F.S., Macedo, G.C., de Almeida, L.A., Carvalho, N.B., The role of innate immune receptors in the control of *Brucella abortus* infection: Toll-like receptors and beyond, *Microbes and Infection* 10 (2008), 1005-1009.
- Paolicchi, F.A., Terzolo, H.R., Campero, C.M., Isolation of *Brucella suis* from the semen of a ram, *Vet.Rec.* 132 (1993) 67.
- Wagner, H., The immunobiology of the TLR9 subfamily, *Trends Immunol* 25(2004) 381-6
- Weiss, D.S., Takeda, K., Akira, S., Zychlinsky, A., Moreno, E., MyD88, but not Toll-like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of *Brucella abortus*, *Infect. Immun.* 73 (2005) 5137-5143.
- Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M.S., Greenblatt, M.B., Bussey, C., Flavell, R.A., Ghosh, S., A Toll like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria, *Science* 303 (2004) 1522-6.
- Zhou, H., Hickford, J.G.H., Polymorphism of Toll-like receptor 9 (*TLR9*) gene in sheep, *Vet.Immunol. Immunopathol.* 121 (2008), 140-143.

EΙΚΟΝΕΣ

- Εικόνα 1: http://c.photoshelter.com/img-get/I0000nxzOSkV_MkY/s
- Εικόνα 2: <http://www.nature.com/nrg/journal/v9/n3/images/nrg2303-f1.jpg>
- Εικόνα 3: http://www.abcam.com/ps/CMS/Images/TLR_fig22.jpg
- Εικόνα 4: [http://mutagenetix.scripps.edu/userfiles/image/TLR9\(3\).gif](http://mutagenetix.scripps.edu/userfiles/image/TLR9(3).gif)

